

UNIVERSITE DU QUEBEC

MEMOIRE PRESENTE A  
UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAITRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR  
PATRICE MORIN

UTILISATION DE L'UV DANS  
L'ETUDE DE LA GERMINATION BACTERIENNE

DECEMBRE 1990

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## RESUME

La germination bactérienne est le processus par lequel une spore à l'état de dormance se transforme en cellule végétative métaboliquement active. L'engagement de la germination est le résultat de l'interaction de molécules spécifiques (germinants) avec la spore. Le mécanisme exact de l'engagement est toujours inconnu. Le présent travail consiste en l'utilisation de l'inactivation UV afin de mieux comprendre ce phénomène. Pour ce faire, une lampe UV haute intensité a été mise au point. De plus, une technique consistant en l'irradiation des bactéries déposées en monocouche sur une lame de verre ou un filtre a été élaborée afin de faciliter les manipulations de l'échantillon et d'uniformiser la fluence UV reçue par les cellules. Les spores de *Bacillus megaterium* en germination à 30 °C traversaient une période transitoire de haute résistance à l'UV qui durait en moyenne 95 secondes dans une spore individuelle. Il a été possible de corrélérer cette phase avec une période de faible photoréactivité de l'ADN. Ceci indique un important changement dans l'environnement et/ou la conformation de l'ADN *in vivo* pendant la germination. L'activation des spores par la chaleur ne changeait pas la durée moyenne de cette phase mais stimulait l'engagement et affectait la cinétique initiale de germination. Ces résultats indiquent que ce traitement affectait plutôt l'engagement que les événements subséquents. Dans un deuxième temps, la cinétique de l'engagement a été étudiée en absence ou en présence d'irradiation pré-engagement. Il a tout d'abord été possible de mettre en évidence une différence dans la photosensibilité des sites d'interaction de la L-alanine et du glucose. L'irradiation influençait fortement la cinétique d'engagement et faisait passer le  $K_m$  pour l'engagement par le glucose de

12 mM à 3.9 mM. Il est conclu que l'inactivation par l'ultraviolet peut permettre, dans certain cas, une meilleure compréhension des systèmes biologiques.

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, Dr. Gérald M. Lefebvre pour ses conseils et ses encouragements qui m'ont aidé à mener à bien ce travail. Mes remerciements vont aussi au CRSNG qui m'a supporté financièrement pendant toute la durée de cette maîtrise.

## TABLE DES MATIERES

	Page
RESUME .....	i
REMERCIEMENTS .....	iii
LISTE DES FIGURES .....	vi
LISTE DES TABLEAUX .....	x
CHAPITRES	
I . INTRODUCTION .....	1
1.1 Présentation du travail .....	1
1.2 Revue de la littérature .....	2
1.2.1 La spore bactérienne .....	2
1.2.2 La germination bactérienne .....	11
1.2.3 Concepts de photobiologie en UV .....	21
1.3 Buts du travail .....	30
II . METHODES EXPERIMENTALES .....	32
2.1 Produits utilisés .....	32
2.2 Culture des bactéries .....	32

2.3 Appareil d'irradiation . . . . .	34
2.4 Expériences de viabilité . . . . .	35
2.5 Expériences de teinturabilité . . . . .	39
2.6 Analyse des photoproduits . . . . .	40
III . RESULTATS ET DISCUSSION . . . . .	45
3.1 Intensité de la lampe . . . . .	45
3.2 Pic de résistance . . . . .	47
3.3 Analyse des photoproduits . . . . .	55
3.4 Effet de l'irradiation pré-engagement sur la germination . . . . .	66
IV . CONCLUSIONS . . . . .	72
REFERENCES . . . . .	73
ANNEXE	
A. ANALYSE THEORIQUE DU PIC DE RESISTANCE . . . . .	84

FIGURE	Page
1. A-Spore bactérienne de <i>Bacillus subtilis</i> telle qu' observée en microscopie électronique (Warth, 1978). B- Schéma général d'une spore bactérienne (Foster & Johnstone, 1990) . . . . .	3
2. Structure du peptidoglycane (Warth & Strominger, 1972) . . . . .	6
3. A-Préparation de spores de <i>Bacillus cereus</i> montrant en microscopie électronique : (A) les trois couches des tuniques (Stelma & al.,1978) et (B) la couche externe (méthode de cryodécapage) (Aronson & Fitz-James, 1975) . . . . .	8
4. Cinétique de différents marqueurs pendant la germination de <i>Bacillus megaterium</i> (Levinson & Hyatt, 1966). . . . .	13
5. Représentation schématique des temps de microlatence et de microgermination d'une spore individuelle pour une propriété $\varepsilon$ quelconque. $\varepsilon_i$ et $\varepsilon_f$ représentent respectivement l'état initial et l'état final de la propriété observée (Leblanc & Lefebvre, 1984) . . . . .	15
6. Perte de densité optique dans un échantillon de spores en germination (Lefebvre & Antippa, 1982) . . . . .	16
7. Modèle de l'engagement de la germination bactérienne (Foster & Johnstone, 1986) . . . . .	20



8. Spectre des radiations électromagnétiques (Jagger, 1967) . . . . .	22
9. Spectre d'absorption des acides aminés : a) tryptophane, b) tyrosine, c) phenylalanine, d) cystine et e) cystéine (McLaren & Shugar, 1964) . .	24
10. Spectre d'absorption des bases azotées (A) et de l'ADN (B) hydrolysé par différentes méthodes (2,3,4) ou non-hydrolysé (1) (Jagger, 1967) . .	25
11. A- Dimère de thymine type cyclobutane. B- Photoproduit de type spore : TDHT (Wang, 1976). . . . .	27
12. Schéma de l'appareil d'irradiation. . . . .	36
13. Séparation des dérivés de thymine par chromatographie . . . . .	43
14. Intensité UV (254 nm) en fonction de la distance de la source . .	46
15. A- Pourcentage de viabilité après une irradiation UV (720 J/m <sup>2</sup> ) en fonction du temps de germination en absence (o) et présence (•) d'une activation par la chaleur (75°C, 30 minutes) exécutée préalablement à l'engagement. B- Courbes correspondantes de teinturabilité vs temps de germination (sans irradiation) . . . . .	48
16. Courbes de viabilité (effet-dose) pour des spores à l'état de dormance (o) ou ayant germé 5 minutes à 30 °C dans le milieu de germination glucose 100mM, L-alanine 1mM et inosine 1mM (•) . . . . .	50

17. Normalisation des courbes de résistance à l'UV vs temps de germination pour des spores ayant subi (•) ou non (o) une activation à la chaleur. Les deux courbes ont été normalisées à 1.0 à leur maximum. . . . . 54
18. La distribution de la radioactivité sur les chromatogrammes de spores hydrolysées. A, Spores n'ayant subi aucune irradiation. B, Spores ayant été irradiées (2.4 kJ/m<sup>2</sup>) après 30 minutes de germination à 30 °C. C, Spores dormantes irradiées (2.4 kJ/m<sup>2</sup>) . . . . . 56
19. Radioactivité dans le pic de TDHT pour des spores dormantes en fonction de la fluence UV. Encart : *Idem* à faible fluence . . . . . 59
20. Cinétique de germination. Quantité de TDHT (A) ou T-T (B) formée par l'irradiation UV (2400 J/m<sup>2</sup>) en fonction du temps de germination. C. Pourcentage de spores teinturables en fonction du temps de germination à 30 °C. Pour les trois graphiques : o, milieu de germination A en contact continu jusqu'à l'irradiation. •, impulsion de 1 minute de contact avec le milieu A suivie d'une période de maturation pour compléter le temps indiqué. □, impulsion de 1 minute avec le milieu de germination B. . . 61
21. Comparaison des courbes % de radioactivité dans le pic de TDHT (•) et % de survie à la chaleur (75 °C) (o) en fonction du temps de germination . . . . . 65

22. Effet de l'irradiation pré-engagement sur le pourcentage de spores engagées par 10 minutes de contact avec le germinant. o, milieu de germination G-100. •, milieu de germination G-100 + L-alanine. . . . 67
23. Pourcentage de spores engagées par un contact au glucose à 100 mM ou 2.5 mM pour les temps indiqués avec (•) ou sans (o) irradiation pré-engagement. . . . . 69
24. Courbes de Lineweaver-Burk obtenues en présence (•) ou absence (o) d'irradiation pré-engagement . . . . . 71

## LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU	Page
1. Liste des produits utilisés . . . . .	33
2. Durée moyenne de l'état de haute résistance chez une spore en germination . . . . .	53
3. Distribution de la radioactivité dans les chromatogrammes de la figure 13. . . . .	58

# CHAPITRE I

## INTRODUCTION

### 1.1 Présentation du travail

Le mécanisme par lequel une spore bactérienne se transforme en bactérie végétative, la germination, est encore mal compris. La compréhension de la façon dont certaines molécules spécifiques peuvent interagir avec la spore pour initier ce phénomène pourrait avoir des répercussions dans tous les domaines de la biologie. Le célèbre chercheur américain Arthur Kornberg affirmait d'ailleurs dans une publication récente (Kornberg, 1989, p. 25): " Sporulation, dormancy and germination are fundamental processes in nature, more accessible to incisive examination, and, if better understood, might yield as much information relevant to the cancer process as some of the massive programs on tumor-bearing animals." Le présent travail consiste à étudier la germination bactérienne et plus particulièrement l'engagement de ce processus en utilisant l'inactivation par l'ultraviolet. La prochaine section présentera les connaissances actuelles nécessaires à la compréhension de ce travail. Les buts du travail pourront ensuite être présentés à la fin du chapitre I. Le chapitre II décrira les différentes méthodes expérimentales utilisées et sera suivi, au chapitre III, de la présentation des résultats et de la discussion. Finalement, les conclusions générales sont dégagées au chapitre IV.

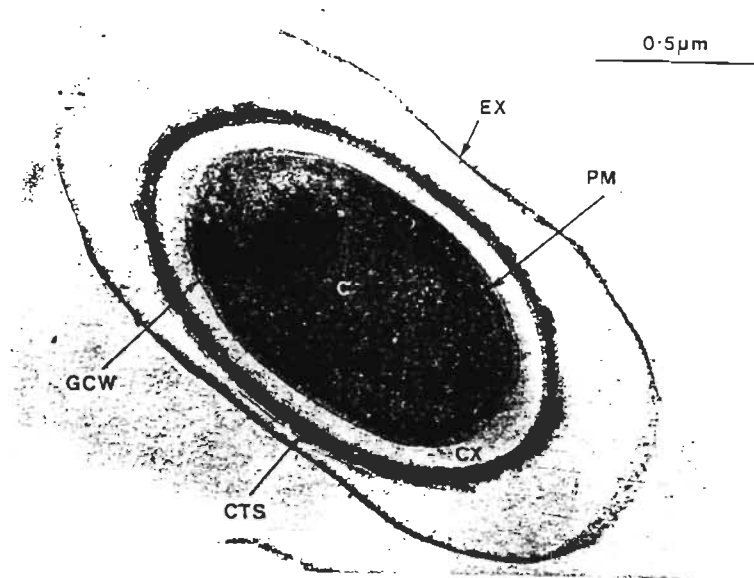
## 1.2 Revue de la littérature

### 1.2.1 La spore bactérienne.

Lors de la sporulation, différenciation d'une cellule végétative en spore bactérienne, plusieurs nouvelles structures sont formées. La spore acquiert de plus une résistance extrême à la chaleur, aux radiations, aux enzymes, aux désinfectants et à d'autres agents létaux. Toutes ces propriétés sont dues à un ensemble de facteurs qui seront présentés plus loin. La figure 1A montre une photographie d'une spore bactérienne typique. Cette dernière est composée du protoplaste (C), de la membrane plasmique (PM), d'une paroi germinale (GCW), du cortex (CX), des tuniques (CTS) et de l'exosporium (EX). Ces structures sont représentées clairement dans le schéma de la figure 1B. Les principales particularités morphologiques et moléculaires de chacune de ces structures seront présentées afin de mieux comprendre les propriétés de la spore bactérienne.

#### i) Le protoplaste et la membrane interne.

Le protoplaste contient les composantes cellulaires (ADN, ARN, enzymes) nécessaires à l'activité cytoplasmique caractéristique des bactéries après leur germination et leur croissance. Plusieurs des activités enzymatiques des cellules végétatives sont retrouvées dans des extraits de spores (Warth, 1978). *In vivo*, ces macromolécules sont dans un environnement contenant une très grande concentration en  $\text{Ca}^{++}$ , en  $\text{Mn}^{++}$  et en dipicolinate mais une faible concentration en  $\text{K}^+$  et  $\text{Mg}^{++}$ , comparativement bien sûr, avec la forme végétative (Crosby & al, 1971).



B

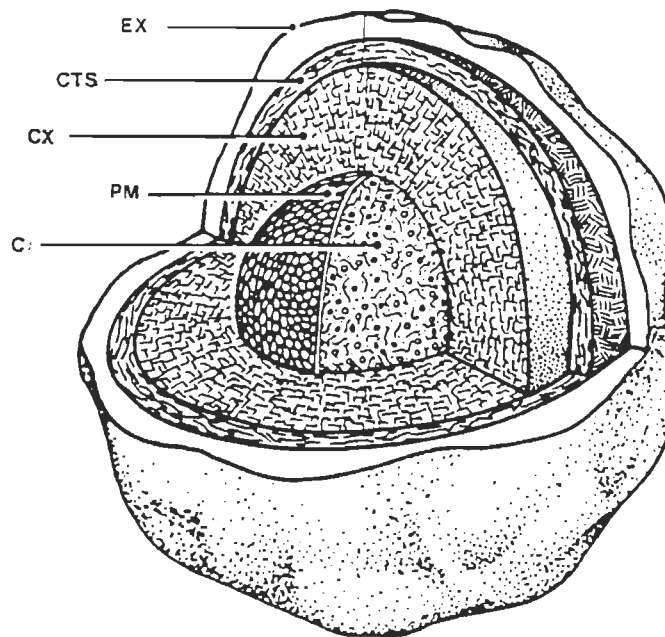


Figure 1. A-Spore bactérienne de *Bacillus subtilis* telle qu' observée en microscopie électronique (Warth, 1978). B- Schéma général d'une spore bactérienne (Foster & Johnstone, 1990).

L'indice de réfraction des spores tel que mesuré par microscopie d'interférence a une valeur semblable (1.55) à ce qu'on retrouve pour des protéines déshydratées (Warth, 1978). La grande réfractilité et la grande densité des spores bactériennes sont une conséquence du faible contenu en eau de ces dernières. Le protoplaste semble être la partie la plus déshydratée (Warth, 1978). Les macromolécules sont donc immobilisées dans un réseau de sels de métaux divalents et d'acide dipicolinique et ce, à l'exclusion presque totale de molécules d'eau. Les solutés en très grande concentration stabiliseraient donc les interactions entre les macromolécules et remplaceraient la phase aqueuse. Cette structure explique en grande partie certaines propriétés uniques de la spore comme l'absence d'activité métabolique et la résistance à la chaleur. Des études ont d'ailleurs démontrées que les protéines sont beaucoup plus résistantes à la chaleur lorsque chauffées sous forme déshydratée (Altman & Benson, 1960). Il semble que la force mécanique permettant la conservation de cet état déshydraté en empêchant l'entrée de solvant soit fourni par le cortex. En effet, ce dernier appliquerait une pression sur le protoplaste en se gonflant selon l'axe radial (Alderton & Snell, 1963). Ceci est appelé le "modèle du gonflement anisotropique". Lors de la germination on assiste par ailleurs à une rapide libération de  $\text{Ca}^{++}$  et de dipicolinate et à une hydratation de la spore.

Certains indices relient la résistance à l'ultraviolet de la spore bactérienne à la complexation de l'ADN avec de petites protéines appelées SASP (Small Acid Soluble Proteins; Setlow, 1988). Ces SASP sont dégradées pendant la germination et servent aussi de réserve d'acides



aminés. Je reviendrai sur ces SASP dans la section sur la photobiologie de la spore bactérienne

Autour du protoplaste se trouve la membrane interne, une bicouche lipidique ne possédant aucune fluidité détectable, présumément à cause de sa structure polycrystalline (Stewart & al.,1980). Comme nous le verrons plus loin, cette membrane contient les sites récepteurs de la germination.

## ii) Le cortex et la paroi germinale.

Le cortex apparaît comme une zone claire en microscopie électronique (figure 1A). La couche interne appelée paroi germinale, se développera en paroi cellulaire lors de la germination (Warth, 1978). Tel que vu précédemment, le cortex aurait un rôle important à jouer dans la conservation de l'état déshydraté du protoplaste.

Le lysozyme peut dissoudre le cortex et habituellement la paroi germinale. L'analyse des produits de digestion a permis de proposer la structure de la figure 2 pour le cortex (Warth & Strominger, 1972). Cette structure s'apparente à celle du peptidoglycane de type I; Il y a cependant quelques modifications propres à la spore : 1) 45-60% des résidus d'acide muramique ne possèdent pas de peptide ni de N-acétyle et possède plutôt un lactame muramique interne. 2) 18% des résidus muramyles ont un peptide tronqué immédiatement après la L-alanine. 3) la quantité de liens interchaînes est beaucoup plus faible. L'ordre des substituants n'est pas aléatoire : les substituants lactames semblent alterner avec les peptides

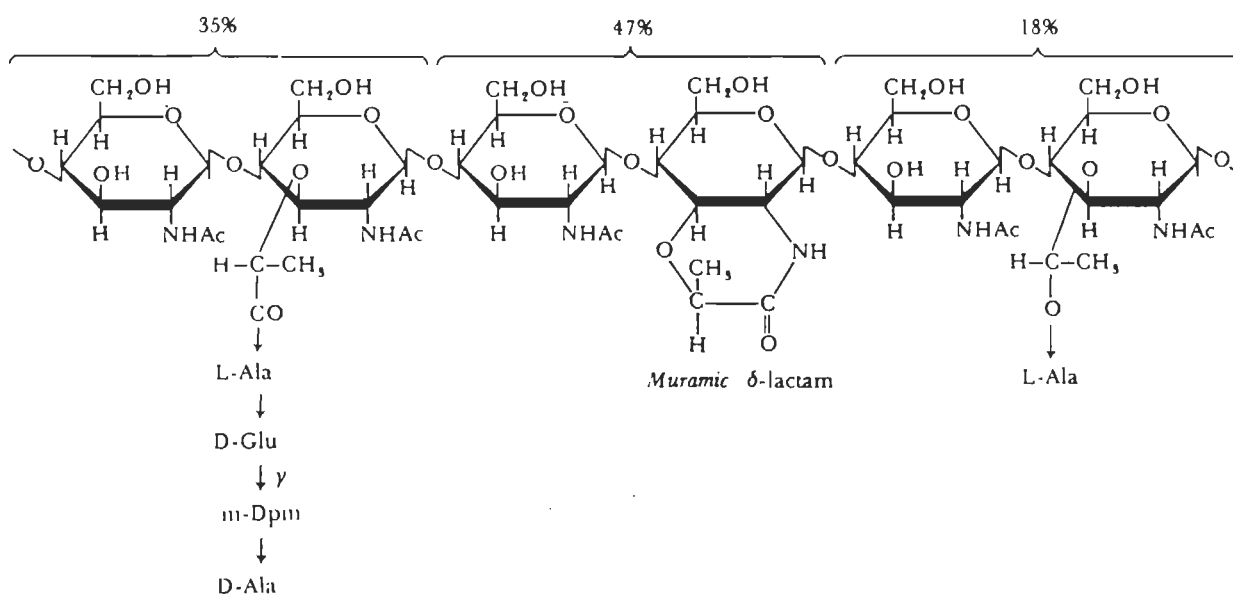


Figure 2. Structure du peptidoglycane (Warth & Strominger, 1972).

(ou la L-alanine). La structure du cortex est très semblable d'une espèce à l'autre indiquant un rôle important pour ce dernier. La structure de la paroi germinale est quelque peu différente de celle du cortex et ne contient pas de lactame muramique (Warth, 1978).

En plus du peptidoglycane, le cortex et la paroi germinale contiennent des enzymes de dégradation. Ces enzymes deviennent actifs lors de la germination : ils dégraderont le cortex mais ne feront que modifier la paroi germinale qui, après cette transformation, deviendra la paroi cellulaire de la bactérie végétative. Les deux principales activités enzymatiques retrouvées dans le cortex sont: 1) Endo-N-Acétyleglucosaminidase (hydrolyse les liens glycosidiques dans la chaîne de peptidoglycan) et, 2) N-Acétylemuramyl-L-alanine amidase (coupe les chaînes peptidiques des chaînes de glycane). Pendant la germination chacun de ces enzymes a une action limitée de telle sorte que l'on retrouve de gros fragments de peptidoglycane (Record & Grinstead, 1954).

### iii) Les tuniques

Les tuniques varient beaucoup en apparence et en complexité d'une espèce à l'autre. Trois couches peuvent habituellement être identifiées (figure 3A). La couche centrale (P) montre souvent un patron laminaire caractéristique alors que la couche interne (UC, undercoat) démontre peu de structure. La couche externe est celle variant le plus d'une espèce à l'autre. La figure 3B montre la couche externe chez *Bacillus cereus*. Les tuniques possèdent certaines similarités avec les kératines (patron de

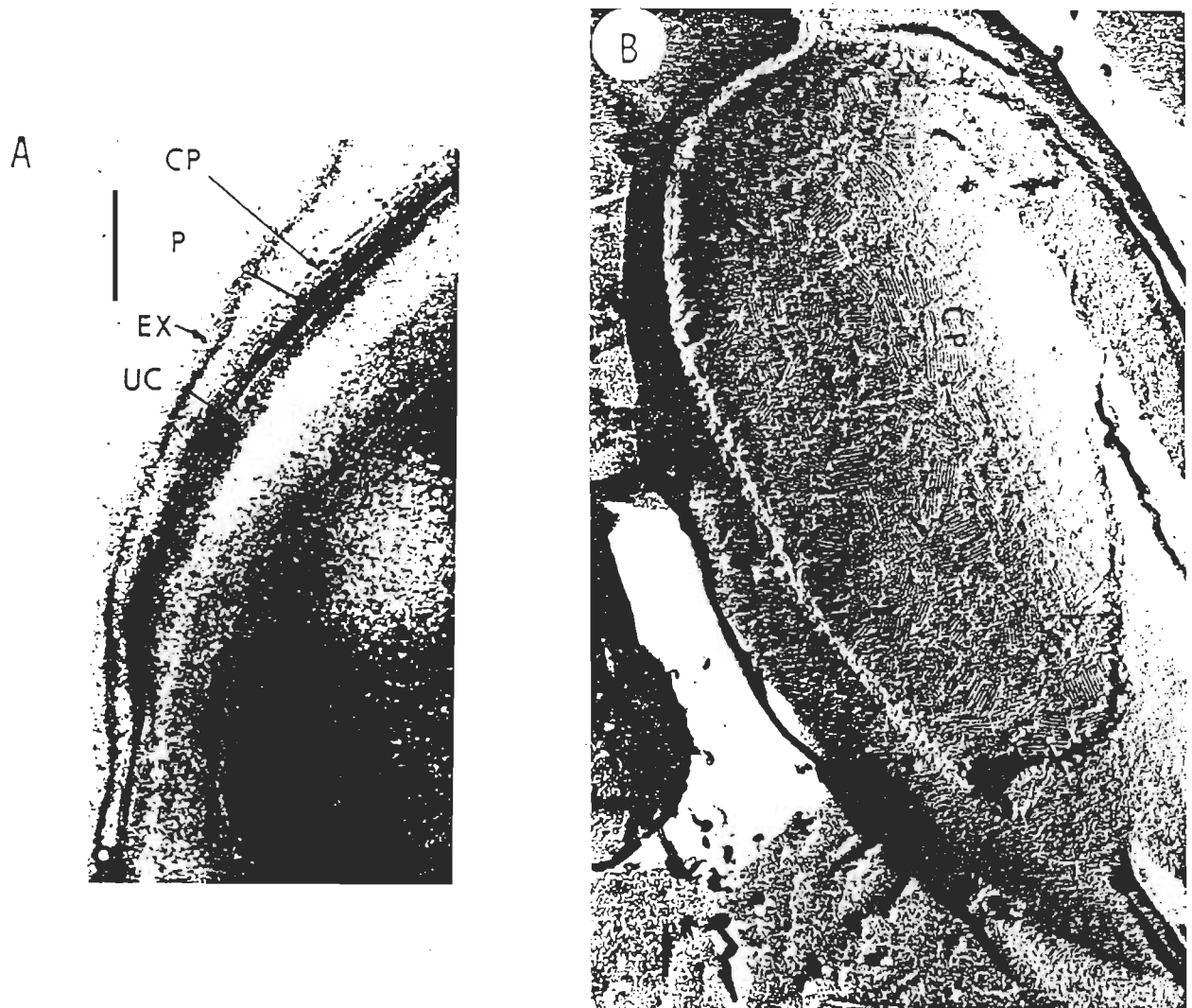


Figure 3. A-Préparation de spores de *Bacillus cereus* montrant en microscopie électronique : (A) les trois couches des tuniques (Stelma & al., 1978) et (B) la couche externe (méthode de cryodécapage) (Aronson & Fitz-James, 1975).

diffraction des rayons X, propriétés d'extraction et de résistance aux enzymes (Kadota & al, 1965).

Les tuniques sont constituées presque exclusivement de protéines structurales. Ces protéines peuvent être solubilisées par un traitement au sodium dodécyl sulfate-dithiothréitol (SDS-DTT) à pH 10 (Vary, 1973). Une telle extraction donne habituellement un polypeptide unique tel que démontré par électrophorèse, par chromatographie d'exclusion et par centrifugation sur gradient de sucrose (Aronson & Horn, 1972). Cette protéine a un poids moléculaire de 12 kd, 14 kd et 15 kd chez *B. cereus*, *B. subtilis* et *B. thiaminolyticus* respectivement et, est très semblable chez toutes ces espèces. De plus, ce polypeptide extrait des tuniques est apparenté au crystal de *Bacillus thuringiensis* tel que démontré par leur composition semblable en acides aminés et par leurs propriétés antigéniques (Somerville, 1970).

Les tuniques ne sont pas impliquées dans la résistance à la chaleur et aux ultraviolets. Des spores ne possédant pas de tuniques (suite à une mutation, inhibition de synthèse, extraction des protéines) ont une pleine résistance à la chaleur et aux radiations et conservent leur  $\text{Ca}^{++}$  et leur acide dipicolinique (Aronson & Fitz-James, 1975; Fitz-James & Young, 1969; Somerville & al., 1970). De telles spores sont cependant sensibles à l'octanol et au lysozyme et peuvent montrer des différences dans leur réponse aux germinants (Warth, 1978). Les tuniques jouent donc un rôle de barrière de perméabilité protectrice empêchant l'accès du lysozyme au peptidoglycane du cortex. D'une façon générale, il est admis que les tuniques sont les structures protégeant les parties intérieures de la spore contre les enzymes et autres substances chimiques. La grande résistance

des tuniques aux enzymes pourrait bien être due à la résistance complémentaire des différentes couches, d'où la complexité morphologique et chimique. De plus, les tuniques procurent la résistance mécanique à la spore.

#### iv) Exosporium et appendices

Les appendices sont retrouvés surtout chez les espèces du genre *Clostridium* et sont des structures amples qui ceignent la spore. L'exosporium, présent plus généralement chez les spores bactériennes, possède une structure variable d'une espèce à l'autre mais est généralement constitué de trois couches :

- 1- couche externe (25 nm)
- 2- couche interne (6 nm)
- 3- couche basale (19 nm)

Les appendices et l'exosporium ont une composition chimique très semblable : Ils sont constitués surtout de protéines mais contiennent aussi des quantités importantes d'hydrates de carbone : glucose, rhamnose et glucosamine. Il n'y a aucune donnée concernant les fonctions de ces structures. Ce ne sont pas des barrières de perméabilité et elles contiennent des ouvertures (Warth, 1978). Etant les structures les plus extérieures, elles doivent donc déterminer les propriétés superficielles des spores comme l'adhésion et l'antigénicité.

### 1.2.2 La germination bactérienne.

La spore bactérienne est l'un des systèmes les plus réfractaires à son environnement qui soit connu en biologie. Pourtant, elle saura détecter dans cet environnement la présence de molécules spécifiques (germinants) et répondra en initiant la germination, processus par lequel elle se transforme en cellule végétative. Ceci n'est qu'un exemple parmi tant d'autres de la faculté qu'ont les bactéries de répondre de façon spécifique à des changements dans leur environnement (Stock & al, 1990). La germination demeure toutefois un phénomène unique et malheureusement mal compris.

#### i) indices de la germination

Le premier évènement, l'engagement, est le processus par lequel la spore est engagée à subir toutes les modifications subséquentes menant à la forme végétative. Une fois la spore engagée, la présence du germinant n'est plus nécessaire à la poursuite des réactions menant à l'état germé (Harrel & Halvorson, 1955). Une activation par la chaleur des spores bactériennes a pour effet de stimuler l'engagement. Après l'engagement, la spore procédera à la dégradation des structures propres à la spore et à l'élaboration des dispositifs nécessaires à l'état végétatif. La germination s'accompagne donc des phénomènes observables suivants :

- 1) Perte de résistance à la chaleur
- 2) Perte de résistance aux différentes substances chimiques

- 3) Changement dans le type de photoproduits observés lors de l'irradiation en UV.
- 4) Perte du dipicolinate et du  $\text{Ca}^{++}$
- 5) Perte de réfractilité
- 6) Teinturabilité : la spore devient perméable à différentes teintures.
- 7) Noircissement sous contraste de phase.
- 8) Changement caractéristique dans la résistance à l'UV.

L'énumération précédente ne reflète pas l'ordre dans lequel ces évènements se produisent. Levinson & Hyatt (1966) ont déterminé la séquence de certains évènements pour *Bacillus megaterium* (figure 4). Certains de ces évènements comme la perte de D.O. (Lefebvre, 1978), la perte de résistance à la chaleur (Stewart & al., 1981), la teinturabilité (Thibeault et Lefebvre, 1984), la résistance à l'UV (Irie & al., 1984) ont été utilisés dans des études détaillées de cinétique de germination.

## ii) La cinétique de germination.

Plusieurs études (Pulvertaft & Haynes, 1951; Vary & Halvorson, 1965; Hashimoto & Friebe, 1969) furent effectuées dans le but d'élucider la nature de ces changements dans une spore individuelle. Il a été possible de mettre en évidence deux étapes distinctes se produisant lors de la germination : une première étape pendant laquelle la propriété étudiée ne change pas chez la spore engagée et une deuxième pendant laquelle le changement lui-même a lieu. Par exemple, la germination d'une spore telle qu'observée au moyen d'un microscope à contraste de phase révélerait tout



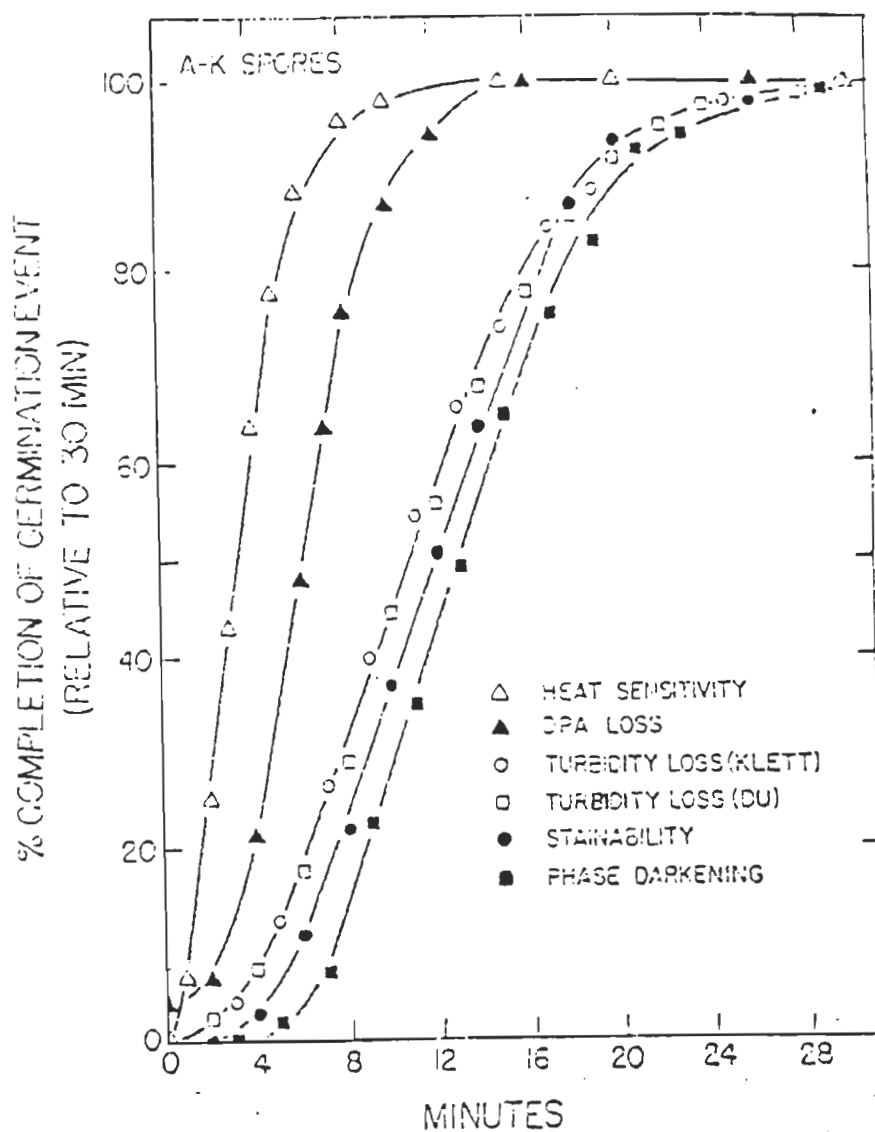


Figure 4. Cinétique de différents marqueurs pendant la germination de *Bacillus megaterium* (Levinson & Hyatt, 1966).

d'abord une période pendant laquelle aucun changement ne se produit (temps de microlatence) suivie du changement proprement dit, appelé microgermination (figure 5, Leblanc & Lefebvre, 1984). Ces temps de microlatence et de microgermination sont très variables d'une spore à une autre pour une propriété donnée. Lorsque le changement est enregistré, comme c'est souvent le cas, sur un très grand nombre de spores, la réponse obtenue est la résultante de la contribution de chacune de celles-ci (figure 6). La distribution des temps de microlatence et de microgermination est donc responsable des courbes obtenues. Une étude par Vary & Halvorson (1965) démontra que le temps de microlatence est distribué sur une plage environ 10 fois plus grande que le temps de microgermination, indiquant l'importance du premier sur l'asynchronisme de l'échantillon.

Un indice est dit ponctuel si le changement s'effectue de façon instantanée dans une spore individuelle. Un marqueur ponctuel a donc un temps de microgermination nul. La teinturabilité, par exemple, est un indice ponctuel : une spore donnée est soit teinturable soit non-teinturable. Il en est de même pour la perte de résistance à la chaleur : la spore est soit viable ou non-viable au traitement à la chaleur. Par contre, la libération de  $\text{Ca}^{++}$  n'est pas un indice ponctuel car ceci peut s'effectuer d'une façon graduelle dans une spore individuelle en germination. L'observation des changements temporels dans un indice ponctuel ne reflète donc pas la cinétique d'engagement mais plutôt la cinétique d'arrivée des spores à cet indice. La construction d'une cinétique d'engagement doit impliquer une exposition au germinant pour des temps variables suivi d'une maturation suffisamment longue pour permettre aux

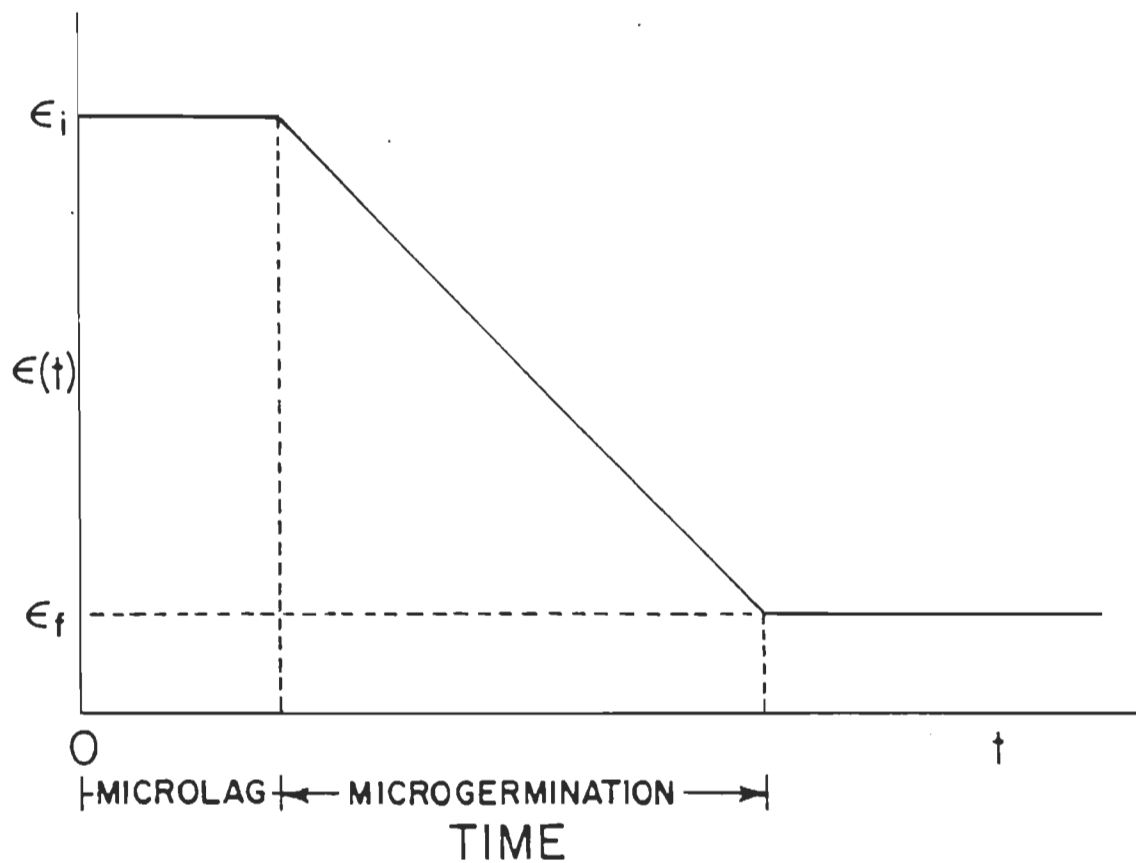


Figure 5. Représentation schématique des temps de microlatence et de microgermination d'une spore individuelle pour une propriété  $\epsilon$  quelconque.  $\epsilon_i$  et  $\epsilon_f$  représentent respectivement l'état initial et l'état final de la propriété observée (Leblanc & Lefebvre, 1984)

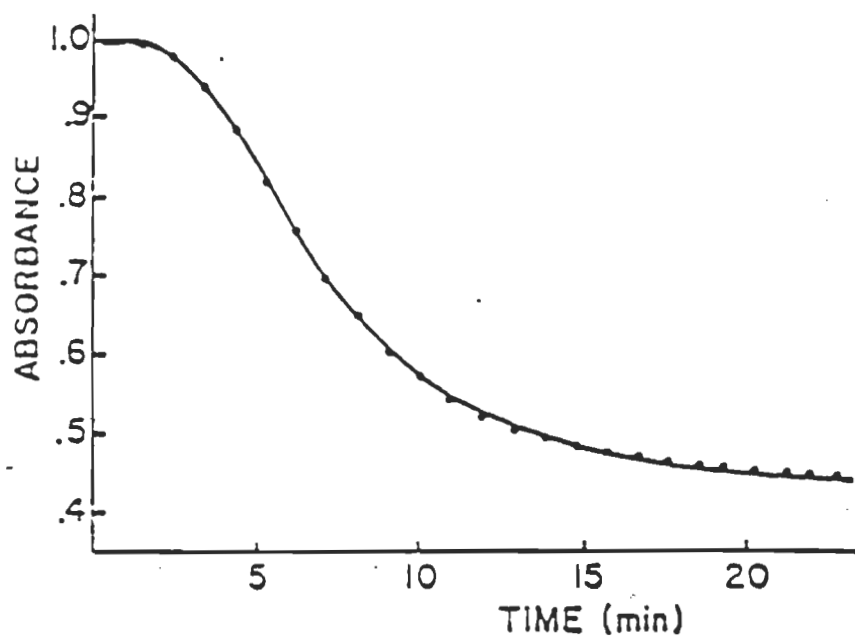


Figure 6. Perte de densité optique dans un échantillon de spores en germination (Lefebvre & Antippa, 1982).

spores d'atteindre l'indice observé. La cinétique d'engagement ne devrait pas, en théorie, dépendre de l'indice utilisé pour l'observer. Des études de cinétique d'engagement pourraient permettre une meilleure compréhension des mécanismes et réactions impliqués dans ce processus.

### iii) Les mécanismes moléculaires de l'engagement.

Les spores bactériennes peuvent être engagées au moyen d'une variété de petites molécules telles les acides aminés, les nucléosides et les sucres. Dépendamment de l'espèce, les spores répondront plus ou moins bien à chacune de ces molécules. Le  $\beta$ -D-glucose par exemple, est très efficace pour engager les spores de *Bacillus megaterium* 14581 (Bédard & Lefebvre, 1989) mais plutôt inefficace chez *Bacillus megaterium* KM, chez qui la L-alanine est le germinant principal (Stewart & al.,1981).

Tous les indices actuels supportent l'idée que la protéine réceptrice se trouve dans la membrane interne. En effet, certains auteurs ont observés une capacité de germination chez des spores ne possédant ni tuniques, ni cortex (Fitz-James,1971; Vary,1973). De plus, la germination chez *Bacillus megaterium* QMB1551 qui répond à la L-proline a pu être étudiée en utilisant un analogue d'affinité (Racine et al,1981; Rossignol & Vary, 1979). Cet analogue, le PCK (L-proline chloromethylcetone) se lie à une protéine de 10,2 kd située dans la membrane interne. Il a aussi été démontré que la L-proline cause *in vitro* des changements dans la fluidité et l'anisotropie de membranes isolées de cette bactérie (Skomurski & al.,1983). Les principaux travaux sur la biochimie et la biologie moléculaire de l'engagement ont cependant été exécutés sur *Bacillus*

*subtilis* 168 et *Bacillus megaterium* par deux équipes en Angleterre. Je décrirai maintenant brièvement ces travaux qui ont été un point tournant dans la compréhension de l'engagement au niveau moléculaire.

Des études génétiques sur *Bacillus subtilis* 168 ont permis d'isoler des mutants germinatifs et d'identifier 13 loci génétiques dont les produits sont impliqués dans la germination (Moir & al., 1979; Moir & Smith, 1985). Ces loci ont été nommés ger A, ger B, etc... (loci 1-13). Certains de ces mutants (ger E, ger J) sont bloqués à des étapes intermédiaires de la germination (Moir, 1981; Warburg & Moir, 1981). Les mutants dans les loci ger A et ger C sont caractérisés par leur impossibilité à germer en réponse à la L-alanine, leur réponse à un mélange de sucres étant toutefois tout à fait normale. Il a donc été postulé que ces loci codent pour les protéines réceptrices spécifiques à la L-alanine (Sammons et al., 1981). L'opéron ger A a été cloné et complètement séquencé (Feavers & al., 1985; Zuberi & al., 1987). Cet opéron est constitué de trois gènes. La séquence des bases de ces gènes a permis de déduire la séquence d'acides aminés des protéines correspondantes. Les deux premiers polypeptides contiennent de longues séquences hydrophobes caractéristiques des protéines membranaires alors que le dernier est plutôt hydrophile et contient un peptide signal de localisation membranaire. Ces trois protéines s'assembleraient donc pour former un complexe membranaire impliqué dans l'engagement par la L-alanine. Il a été démontré que cet opéron n'est transcrit que pendant la sporulation (Zuberi & al., 1987).

L'isolation par Moir de mutants pouvant s'engager normalement mais dont la progression de la germination est bloquée laissait supposer l'implication séquentielle de plusieurs protéines. L'équipe de Johnstone a pu isoler un enzyme dégradant le cortex lors de la germination chez *Bacillus megaterium* ( Foster & Johnstone, 1987). Cet enzyme (Germination Cortex- Lytic Enzyme, GCLE) ne peut pas être extrait de spores dormantes mais apparaît très tôt lors de la germination. Etant donné que la synthèse protéique ne survient que beaucoup plus tard dans la germination, GCLE serait donc présent sous forme inactive. Il a été postulé que cet enzyme serait activé par le site récepteur primaire (lui-même activé par le germinant) et pourrait par la suite dégrader le cortex, structure essentielle dans le maintien de l'état dormant (Foster & Johnstone, 1990). Des travaux de ces mêmes auteurs avaient préalablement démontré l'existence de deux sites d'inhibition par le  $\text{HgCl}_2$  : un site pré-engagement (site I) et un site post-engagement (site II) (Foster & Johnstone, 1986). La présence de D-alanine protège le site I de l'action du  $\text{HgCl}_2$ , indiquant clairement qu'il se situe au niveau du récepteur de la L-alanine. Le second site a par la suite été associé au GCLE en comparant les profils d'inhibition de cet enzyme avec ceux de la germination (Foster & Johnstone, 1987).

Tous les résultats précédents supportent le modèle présentement accepté pour la germination (figure 7) (Foster & Johnstone, 1986; 1990). L'activation par la chaleur active le complexe récepteur de la L-alanine ( $R \rightarrow R^*$ ) qui peut ensuite être engagé par la L-alanine ( $R^* \rightarrow R^{**}$ ). Cette première réaction est le premier site d'inhibition du  $\text{HgCl}_2$ .  $R^{**}$  a une activité protéolytique qui transforme un pro-enzyme en un enzyme activé

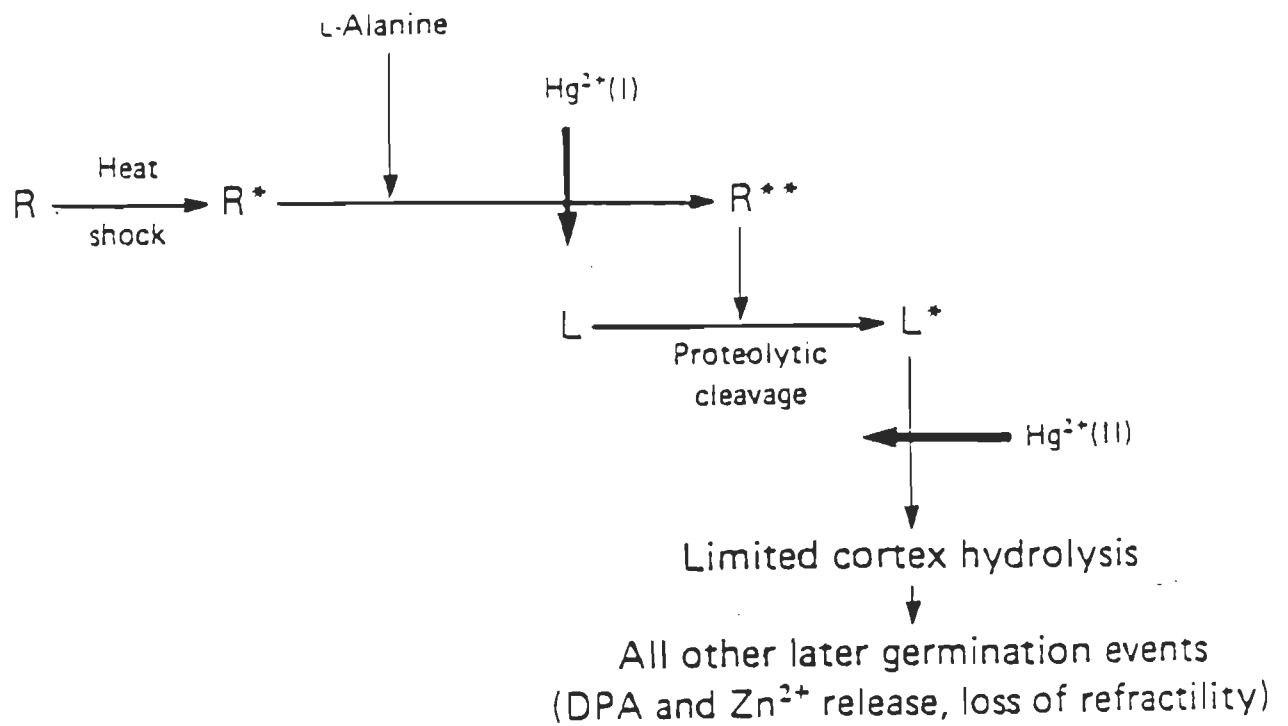


Figure 7. Modèle de l'engagement de la germination bactérienne (Foster & Johnstone, 1986).



dégradant le cortex ( $L \rightarrow L^*$ ;  $L^* = \text{GCLE}$ ). Cet enzyme est lui aussi sensible au  $\text{HgCl}_2$  (site II). L'hydrolyse du cortex permet l'hydratation de la spore et la poursuite des autres événements germinatifs. La ressemblance dans la structure du cortex chez les différentes espèces ainsi que la présence des mêmes événements germinatifs ont permis de proposer un mécanisme universel pour la germination (Foster & Johnstone, 1990). La différence dans la spécificité du site récepteur ne serait relié qu'à une divergence évolutive.

### 1.2.3 Concepts de photobiologie en UV.

#### i) Généralités

Le spectre électromagnétique est représenté à la figure 8. Les rayons X ainsi que les radiations plus énergétiques peuvent ioniser les atomes et molécules et sont appelés radiations ionisantes. La frontière entre l'ultraviolet et les rayons X n'est pas toujours bien définie. En biologie cependant, on considère que la région des UV s'arrête aux environs de 1000 Å, point au delà duquel pratiquement tous les atomes et molécules peuvent être ionisés. L'UV est donc considéré essentiellement comme une radiation non-ionisante. Le point 1000 Å représente aussi la frontière entre la radiobiologie et la photobiologie. L'UV est habituellement divisé en trois parties : l'UV extrême ou du vide (1000 à 1900 Å), l'UV lointain (1900-3000 Å) et le proche UV (3000-3900 Å).

#### ii) Absorption des molécules biologiques dans la région de l'ultraviolet.

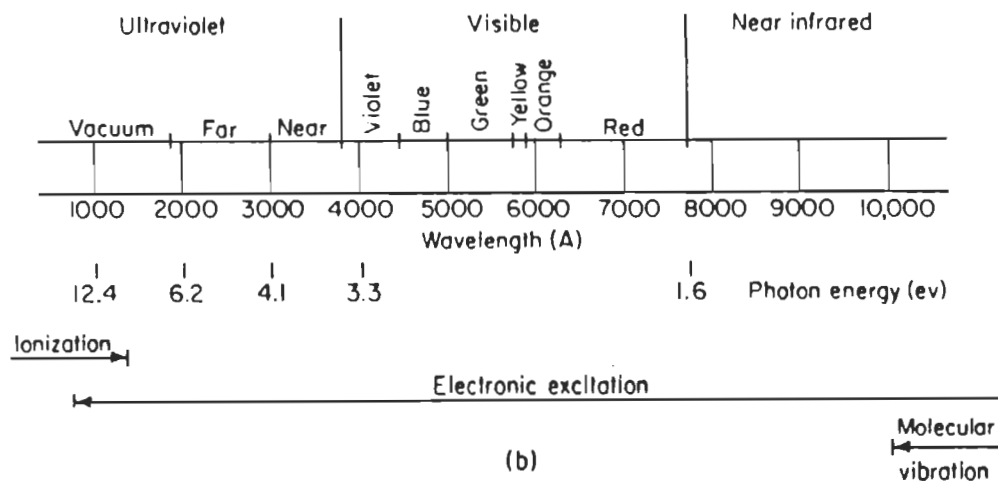
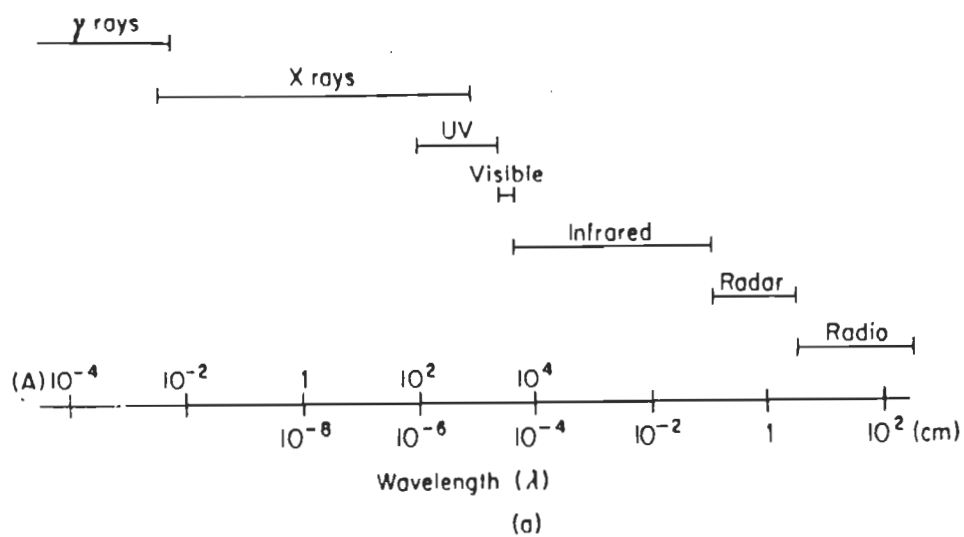


Figure 8. Spectre des radiations électromagnétiques (Jagger, 1967).

A quelques exceptions près, seuls les composés organiques insaturés absorbent de façon significative dans l'UV au-dessus de 2200 Å.

Protéines. Les composantes des protéines les plus importantes pour l'absorption UV sont les acides aminés aromatiques et les liens peptidiques. La tyrosine et le tryptophane sont les deux acides aminés démontrant la plus forte absorption dans l'UV au-dessus de 2500 Å (figure 9). La phénylalanine et la cystine peuvent aussi devenir les principaux absorbeurs dans des protéines ne contenant pas ou peu de tyrosine et de tryptophane. Les liens S-S de la cystine peuvent être brisés par l'UV (Augenstein & Riley, 1964). Les liens peptidiques sont aussi considérés comme des absorbeurs non négligeables à cause de leur présence en grande quantité dans toutes les protéines.

Acides nucléiques. Les bases azotées des acides nucléiques sont toutes à caractère aromatique et absorbent fortement dans l'UV éloigné. Les acides nucléiques absorbent de 10 à 20 fois plus qu'un poids égal en protéines (Jagger, 1967). La figure 10 montre des spectres d'absorption pour des bases et pour l'ADN.

### iii) Inactivation et mutation

Chez les bactéries et autres procaryotes, l'absorption par les acides nucléiques est considérée comme étant responsable de la majeure partie des effets résultants de l'irradiation dans la région 2400-2800 Å. Ceci provient du fait que l'ADN est le siège de l'information génétique et que l'altération d'un seul gène peut causer la mort de la cellule. Par contre,

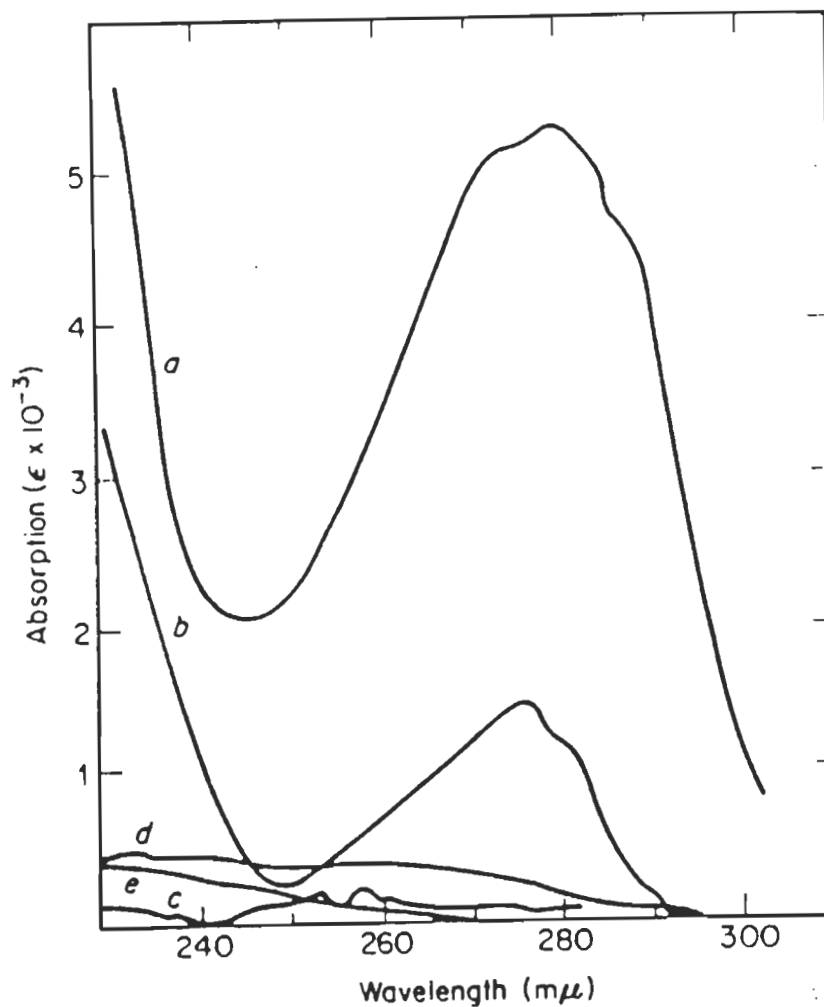


Figure 9. Spectre d'absorption des acides aminés : a) tryptophane, b) tyrosine, c) phenylalanine, d) cystine et e) cystéine (McLaren & Shugar, 1964).

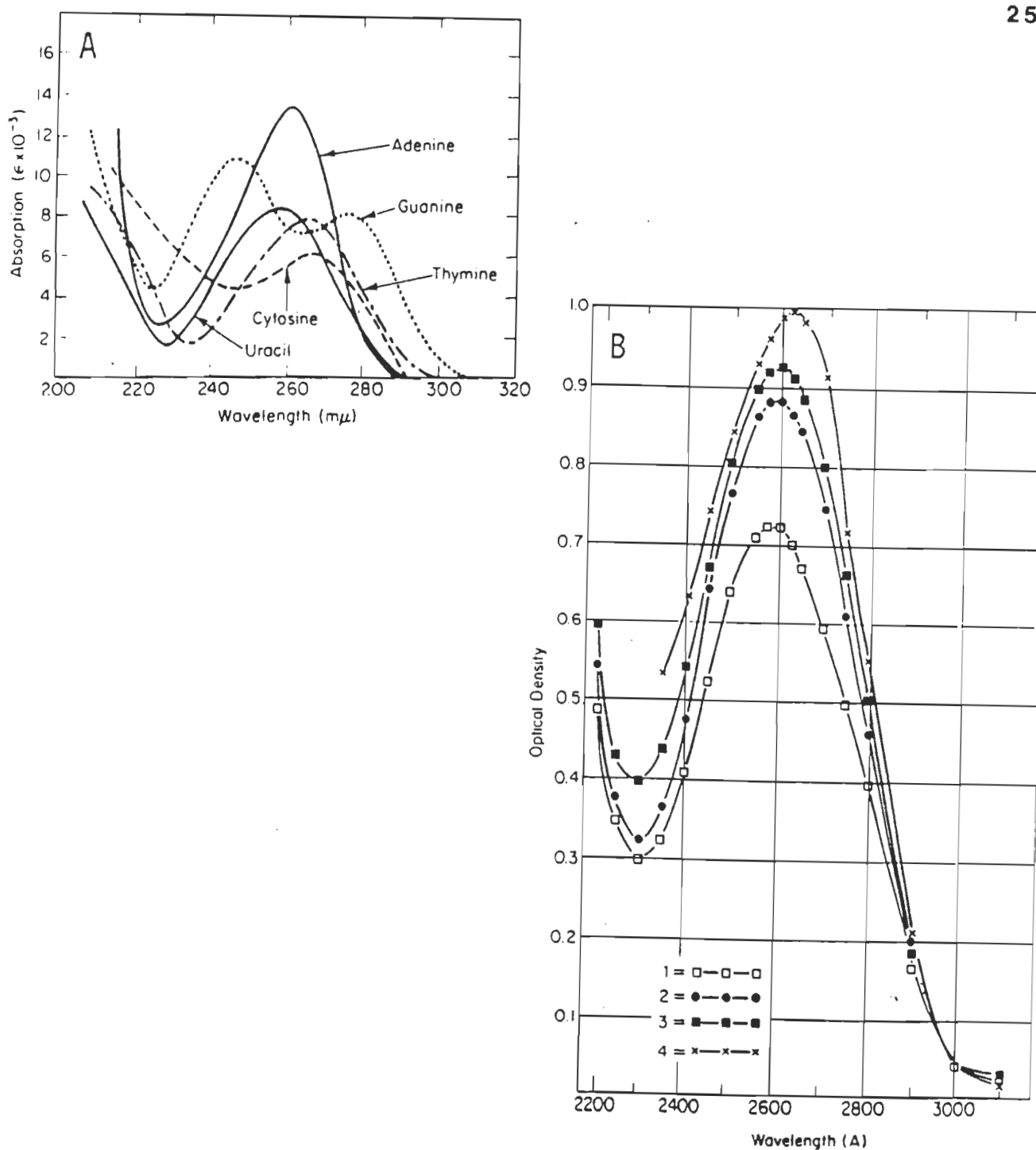


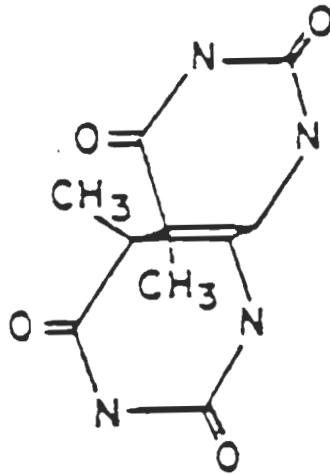
Figure 10. Spectre d'absorption des bases azotées (A) et de l'ADN (B) hydrolysé par différentes méthodes (2,3,4) ou non-hydrolysé (1) (Jagger,1967).

l'inactivation d'une des nombreuses copies d'une protéine n'aura pas de conséquences aussi graves. Les preuves expérimentales de cette affirmation proviennent des spectres d'action pour la perte de viabilité et les mutations qui montrent une forte corrélation avec les spectres d'absorption des acides nucléiques (Gates,1930). Les expériences de Gates ont été exécutées avant même qu'il ne soit clairement établi que l'information génétique se trouve dans les acides nucléiques.

La perte de viabilité, c'est à dire l'impossibilité pour une bactérie de former une colonie visible après l'UV est donc attribuée à des lésions au niveau de l'ADN. Les principales lésions causées par L'UV sont les dimères de thymine. Ces dimères sont formés par la liaison de deux thymines adjacentes sur un même brin d'ADN, et ce, au profit du lien double 5-6 de ces thymines (figure 11a). Plusieurs évidences suggèrent que ce type de lésion est le principal responsable de la mort cellulaire (Greer,1960; Haynes,1964). D'autres types de dimères sont retrouvés dans des cellules ayant subi une irradiation UV mais semblent moins importants.

L'inactivation par l'UV des protéines peut être étudiée *in vivo* et *in vitro* . L'approche la plus souvent utilisée consiste à examiner la diminution d'une activité enzymatique précise conséquemment à une irradiation UV. Ceci peut se faire sur des enzymes purifiés (Augenstein & Riley,1964) ou sur des cellules intactes (Ascenzi & Jagger,1979). La théorie la plus universellement acceptée veut que l'inactivation des enzymes soit dûe à une disruption des liens disulfures et des liens H dans des régions essentielles à l'activité enzymatique (Augenstein & Riley,1964). L'inactivation UV a été utilisée avec succès dans l'étude de

A



B

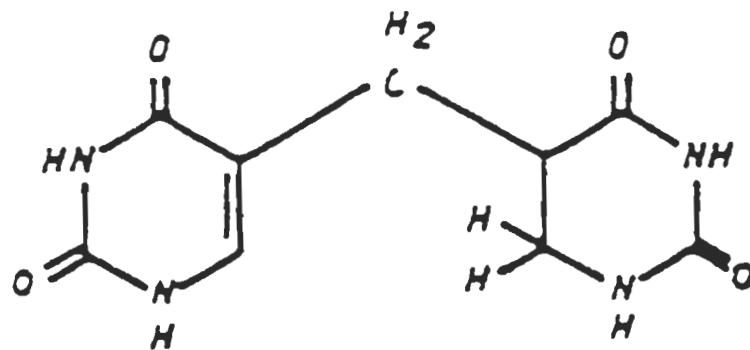


Figure 11. A- Dimère de thymine type cyclobutane. B- Photoproduit de type spore : TDHT (Wang, 1976).

plusieurs phénomènes biologiques. Citons l'équipe de Jagger qui étudie les transporteurs membranaires d'acides aminés chez *Escherichia coli* au moyen de cette technique (Ascenzi & Jagger, 1979; Sharma & Jagger, 1981).

#### iv) Photobiologie de la spore bactérienne.

A cause de sa structure (Section 1.2.1), la spore bactérienne possède une très grande résistance à différents agents létaux, dont les ultraviolets. Dans les spores irradiées, on ne retrouve pas le traditionnel dimère de thymine type cyclobutane (Donnellan & Setlow, 1965) mais plutôt un dimère de thymine qui fut identifié comme étant le 5-thyminyl-5, 6-dihydrothymine ou plus simplement TDHT (Varghese, 1970). La structure de cette molécule se trouve à la figure 11B. Ce photoproduit de type spore est réparé efficacement pendant la germination par au moins deux mécanismes dont un est spécifique au TDHT et retransforme *in situ* le dimère en deux thymines (Wang & Rupert, 1977). Ce dernier type de réparation, appelé spore-repair, s'effectue en l'absence de lumière et ne peut donc pas être associé à la photoréactivation. L'efficacité de réparation de ce photoproduit est responsable de la grande résistance à l'UV des spores bactériennes.

L'ADN de la cellule en état végétatif est en conformation B alors que cette molécule est en conformation A dans la spore bactérienne (Baillie & al., 1974). Ceci est d'ailleurs confirmé par des études sur la photochimie de l'ADN qui montrent que la formation du dimère de thymine type cyclobutane est caractéristique de la conformation B tandis que le TDHT



est formé par l'irradiation de l'ADN en conformation A (Varghese, 1970). Setlow a découvert chez les spores bactériennes une série de protéines appelées SASP : Small Acid Soluble Spore Proteins (Setlow, 1978). Des mutants de délétion ne contenant pas les SASP- $\alpha$  et SASP- $\beta$  produisent des spores beaucoup plus sensibles aux UV (Mason & Setlow, 1986). L'irradiation de ces spores mutantes provoque la formation d'une quantité appréciable de photoproduits de type cyclobutane et beaucoup moins de TDHT (Setlow & Setlow, 1987). Les SASP semblent donc jouer un rôle dans la conservation de la conformation A de l'ADN dans les spores bactériennes. Ces protéines sont effectivement associées avec l'ADN *in vivo* (Setlow & Setlow, 1979) mais le mécanisme exact par lequel elles influencent la photochimie de cette molécule est encore inconnu (Setlow, 1988).

Malgré la très grande résistance à l'UV de sa forme dormante, la spore bactérienne devient transitoirement encore plus résistante pendant la germination (Stuy, 1956; Stafford & Donnellan, 1968; Weinberger & al, 1984; Setlow & Setlow, 1988; Morin & Lefebvre, 1989). Pendant la germination, l'ADN de la spore doit évidemment passer de la conformation A (spore) à la conformation B (forme végétative). Stafford & Donnellan (1968) suggérèrent que la haute résistance est causée par la formation, pendant la germination, d'une conformation intermédiaire ne favorisant pas la formation de photoproduits. Plus tard, Wang & Rupert (1977) identifièrent un mécanisme de réparation chez *Bacillus subtilis* qui, selon eux, est responsable pour la haute résistance transitoire. Ce mécanisme, appelé excision-réparation germinatif, excise les dimères de thymine type cyclobutane et ne survient que transitoirement pendant la germination.

Des données récentes indiquent cependant que ce système de réparation n'est pas responsable de la phase hautement résistante. En effet, plusieurs études cinétiques ont démontré que cette phase s'accompagne d'une diminution dans la photoréactivité de l'ADN (Irie & al, 1982a; 1986). De plus, des expériences sur des spores mutantes ne contenant pas les SASP- $\alpha$  et  $\beta$  ont démontré que ces spores ont perdues leur haute résistance transitoire (Setlow & Setlow, 1988). Ces résultats s'expliquent en se souvenant que les SASP sont impliquées dans le maintien de l'ADN dans la conformation propre à la spore. Etant donné que ces mutants ont déjà leur ADN dans la conformation B, le changement de conformation de l'ADN pendant la germination n'a plus lieu et la phase peu réactive de l'ADN disparaît.

### 1.3 Buts du travail

Ce travail a pour but l'investigation des possibilités qu'offre l'ultraviolet dans l'étude de la spore bactérienne et de la germination. La germination étant un phénomène cinétique, il est primordial de disposer d'une lampe de très haute intensité afin de conserver les temps d'exposition courts. La première partie de ce travail consiste en la mise au point de cet appareil. La deuxième partie consiste en l'utilisation de cette lampe pour : 1) obtenir des courbes de cinétique de germination en utilisant la phase hautement résistante (HR) comme marqueur, 2) vérifier s'il est possible de corréliser cette phase avec une faible photoréactivité transitoire de l'ADN et, 3) étudier l'effet de l'UV sur les structures impliquées dans l'engagement de la germination afin, si possible, de mieux

comprendre les mécanismes en cause. La haute intensité de la lampe est essentielle pour les deux premiers points : tout comme en photographie, un temps d'exposition trop long pour observer un phénomène cinétique aurait pour effet de donner une image floue de ce dernier, image comportant un mélange de plusieurs états. Le dernier objectif ne repose pas sur l'intensité de la lampe car les spores seront irradiées alors qu'elles se trouvent dans leur état dormant, avant tout contact avec le germinant. Une telle étude de l'inactivation UV du système germinatif des spores bactériennes n'a jamais été réalisée. Cette partie du travail se veut donc une exploration des possibilités de ce type d'expérience.

## CHAPITRE II

### METHODES EXPERIMENTALES

#### 2.1 Produits utilisés

Tous les produits chimiques utilisés au cours de ce travail se trouvent au tableau 1. Deux milieux de germination ont été utilisés : le milieu GLI-100, constitué de  $\beta$ -D-glucose (100 mM), L-alanine (1mM) et inosine (1mM) dans un tampon phosphate 50 mM ajusté à pH 7.0 et le milieu G-100, constitué seulement de  $\beta$ -D-glucose 100 mM dans le même tampon. Ces milieux étaient filtrés avant l'utilisation.

#### 2.2 Culture des bactéries.

*Bacillus megaterium* ATCC 14581 a été obtenu de ATCC (Etats-Unis) peu avant le début de ce projet. Le milieu de sporulation était préparé en ajoutant à un litre d'eau purifié :  $\text{FeSO}_4$  (1mg),  $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (10 mg),  $\text{MgSO}_4$  (0.8 g),  $\text{MnSO}_4$  (0.5 g),  $\text{CaCl}_2$  (1g), Agar (15 g), Beef Extract (3 g) et peptone BBL (5 g). La gélose était ensemencée avec des bactéries sous forme végétative provenant d'une culture parallèle repiquée régulièrement et conservée à 4°C. L'incubation à 30°C durait 5 jours. La récolte était effectuée en lavant la surface de la gélose avec 20 ml d'eau froide (4°C) déminéralisée. Les cellules récoltées étaient centrifugées dans l'eau déminéralisée huit fois à 3000 g (4°C) à raison de deux centrifugations par jour. A chaque centrifugation la partie supérieure du culot était décollée et jetée en même temps que le surnageant. Cette partie contenait principalement des cellules végétatives ainsi que

PRODUIT	PROVENANCE	SPECIFICATIONS
ACIDE ACETIQUE GLACIAL	FISHER	ACS
ACIDE FORMIQUE 88%	MALLINCKRODT	ACS
L-ALANINE	SIGMA	ACS
BACTO-PEPTONE	DIFCO	DIFCO-CERTIFIED
BUTANOL-1	FISHER	ACS
DEXTROSE	FISHER	ACS
EAU	PURIFIEE SUR SYSTEME DE FILTRATION MILLIPORE	18 M cm
EXTRAIT DE BOEUF	BBL	POUR MILIEU DE CULTURE
$\beta$ -D-GLUCOSE	SIGMA	ACS
INOSINE	SIGMA	ACS
POPOP	NEW ENGLAND NUCLEAR	SCINTILLATION GRADE
PPO	NEW ENGLAND NUCLEAR	SCINTILLATION GRADE
SELS (NaCl, NaOH, etc.)	FISHER	ACS
THYMIDINE TRITIEE	NEW ENGLAND NUCLEAR	PURETE CHIMIQUE > 95 %

Tableau 1. Liste des produits utilisés .

d'autres débris moins denses que les spores. Après ce traitement de quatre jours, la suspension contenait plus de 99.9% de spores tel qu'observé sous contraste de phase. Les spores étaient conservées à 4°C dans l'eau déminéralisée pour un maximum de deux mois. Pendant ce temps elles pouvaient être utilisées pour des expériences sans qu'aucun changement ne soit observé dans leurs propriétés germinatives.

### 2.3 appareil d'irradiation

La première étape de ce projet consistait à mettre au point un appareil pouvant permettre d'irradier de façon reproductible des échantillons biologiques. De plus, l'intensité devait être suffisamment élevée pour permettre des durées d'irradiation négligeables sur l'échelle du temps de la germination. Une lampe de très haute intensité UV conçue pour effacer des EPROM (UV-Erasable Programmable ROM) fut achetée (Spectronics, modèle PR-320T) et transformée de façon à pouvoir être utilisée pour du travail quantitatif. Les quatre modifications principales sont :

1) Tiroir remplacé par une chambre d'irradiation permettant l'ajustement de la distance échantillon-lampe.

2) Ajout d'un obturateur (Uniblitz, modèle 262X) afin de pouvoir contrôler de façon précise le temps d'exposition.

3) Mise en place d'un système de refroidissement qui assure une stabilité dans la température d'utilisation. Ceci est particulièrement

important car l'intensité de la bande à 2540 Å varie avec la température de la lampe (Calvert & Pitts,1966).

4) Ajout d'un régulateur de voltage au niveau de l'alimentation du transformateur de la lampe. Ceci régularise la tension sur le tube à mercure et procure ainsi une plus grande stabilité à la lampe (Calvert & Pitts, 1966).

Le schéma de l'appareil d'irradiation se trouve à la figure 12. Avant chaque expérience, la lampe était réchauffée 20 minutes afin de s'assurer que l'intensité se soit stabilisée (Jagger,1967). L'intensité de la lampe était mesurée lors de chaque utilisation avec un radiomètre Spectronics (Modèle DRC 100X) équipé d'une sonde 254 nm (Modèle DIX 254). L'intensité était mesurée à différentes distances de la lampe ce qui permettait d'évaluer l'intensité UV à la position de l'échantillon.

#### 2.4 Expériences de viabilité

Les expériences décrites dans cette section peuvent se diviser en trois étapes : 1) la germination, 2) l'exposition à l'agent physique (UV ou chaleur) et 3) l'évaluation des survivants (formation de colonies). La manipulation des échantillons au travers cette série d'étapes est grandement simplifiée si les spores sont préalablement déposées sur des membranes filtrantes (Powers & al.,1957). Toutes les expériences impliquant l'utilisation de membranes filtrantes seront maintenant décrites en détail.

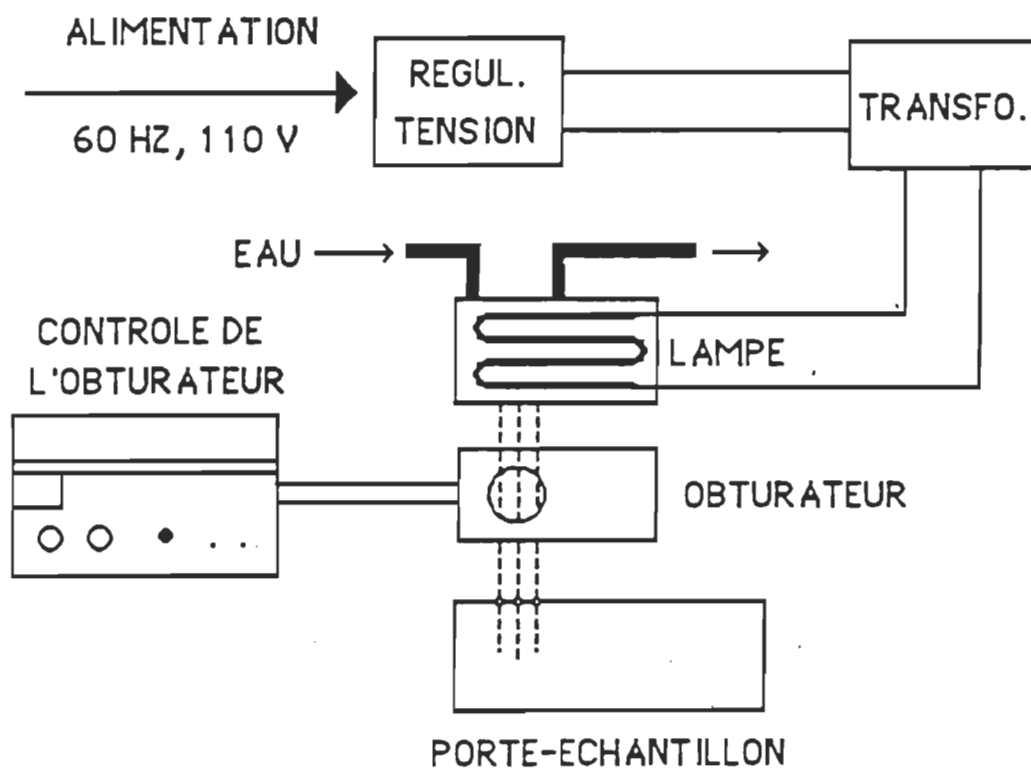


Figure 12. Schéma de l'appareil d'irradiation.



i) Résistance à l'UV pendant la germination. Un volume approprié d'une suspension-stock de spores dans l'eau agité magnétiquement était déposé sur des membranes filtrantes Gelman 0.2  $\mu\text{m}$  pré-stérilisées (modèle Supor 200, 47 mm). La concentration de la suspension était préalablement ajustée à environ 350 spores/ml. Pour certaines de ces expériences, les spores avaient été activées en milieu liquide à 75 °C pour 30 minutes préalablement à la déposition sur les filtres. Les filtres sur lesquels se trouvaient les spores étaient subséquemment déposés sur des tampons absorbants Gelman pour fin de séchage (1 heure). Ces filtres étaient par la suite montés sur un entonnoir Gelman dans lequel était versé 2 ml du milieu de germination GLI-100 stérile (voir partie 2.1) à 30 °C. Après une minute de contact, le milieu était retiré par filtration et les filtres rincés avec du tampon  $\text{PO}_4$  stérile à 30 °C afin d'enlever les germinants. La germination des spores engagées était par la suite poursuivie pour des temps variables en conservant les filtres en présence de tampon  $\text{PO}_4$  à 30 °C. Pour l'irradiation, les filtres étaient transférés dans l'unité d'irradiation et subissaient une exposition à l'UV de 3 sec. (720 J/m<sup>2</sup>). Une série de filtres n'ayant pas été en contact avec le germinant subissait une irradiation identique pour fin de contrôle (résistance à t=0). Après un séchage d'une heure, les filtres étaient déposés dans un pétri contenant le milieu nutritif préalablement filtré constitué de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (2.5 g/l);  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (5g/l); NaCl (0.5 g/l), dextrose (2.5 g/l) et peptone (5g/l). Les pétris étaient par la suite incubés à 30 °C pour 16 heures, période au bout de laquelle les colonies visibles étaient dénombrées. Une série de filtres ayant reçus 0.25 ml de spores et n'ayant subi aucune irradiation était exécutée afin de déterminer exactement la concentration de la solution stock et, du même coup, la quantité de spores initialement déposée sur

chacun des filtres. A noter qu'en l'absence de traitements létaux (UV, chaleur, etc.), pratiquement 100% des spores forment une colonie sur le milieu décrit plus haut (Powers & al., 1957). La quantité de spores sur les filtres était ajustée de façon à ce qu'il y ait toujours entre 80 et 100 colonies viables par filtre. Le nombre initial de spores sur le filtre (tel que déterminé en l'absence d'irradiation) ainsi que le nombre de colonies étant connus, le pourcentage de survivants était facilement calculé. Pour chaque expérience, un point était constitué de 4 répétitions indépendantes (4 filtres différents). Chacune des expériences était exécutée à trois reprises afin de s'assurer de la validité des résultats.

ii) Courbes Effet-Dose. Les spores étaient déposées sur des filtres tel que décrit précédemment. Des spores en état de dormance ou ayant été en contact pendant 5 minutes avec le milieu germinatif GLI-100 décrit plus haut étaient irradiées avec une fluence variable. La fluence était contrôlée en ajustant le temps d'ouverture de l'obturateur ( $240 \text{ J m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ ). La quantité de spores initialement déposée sur le filtre dépendait de la fluence qu'allait subir ce dernier. Après l'irradiation, les filtres étaient séchés pour 1 heure. Les conditions de culture et d'énumération des colonies sont telles que décrites à la section précédente. Les courbes effet-dose ont été obtenues en traçant le logarithme du pourcentage de survivants vs la fluence.

iii) Résistance à la chaleur. Les spores déposées sur des filtres étaient germées pour des temps variables au moyen d'un contact continu avec le milieu de germination GLI-100. Après cette période, les filtres étaient montés dans un entonnoir Gelman et étaient recouverts de 100 ml de

tampon phosphate stérile chauffé à 75 °C. Après un contact de 10 minutes à la chaleur, le liquide chaud était retiré par filtration et les filtres étaient séchés pendant 1 heure. Les filtres étaient par la suite déposés sur le milieu de croissance et le nombre de colonies viables était déterminé tel que décrit à la section i).

## 2.5 Expérience de teinturabilité

Une aliquote de 0.05 ml d'une suspension de spore ( $3 \times 10^8$  spores/ml) était déposé en monocouche sur une lame de verre (Thibeault & Lefebvre, 1984). Les spores s'étendaient sur la surface pour former un cercle d'environ 1.5 cm de diamètre et étaient séchées sous vide pendant environ 10 minutes. La grande propreté de la lame était essentielle. Pour certaines de ces expériences, les spores avaient été activées en milieu liquide à 75 °C pour 30 minutes préalablement à la déposition sur les lames. Au temps zéro, les lames sur lesquelles se trouvaient les spores étaient placées dans un bécher contenant le milieu germinatif approprié à 30 °C. Après le contact avec le germinant, les lames étaient soit séchées immédiatement dans un courant d'air chaud (expérience de germination), soit rincées et transférées dans un bécher ne contenant que le tampon afin que toutes les spores engagées puissent atteindre la teinturabilité (expérience d'engagement). Les spores se trouvant dans le tampon étaient maintenues à cet endroit pour 1 heure avant d'être elles aussi séchées dans un courant d'air chaud. Par la suite, une goutte de bleu de méthylène 1% était déposé sur une lamelle et cette dernière mise en contact avec le rond de spore séché. L'échantillon était examiné en microscopie à

contraste de phase et quatre différents champs étaient photographiés. Les diapositives résultantes étaient par la suite projetées sur un écran et le pourcentage de spores teinturables aisément déterminé. Les spores teinturables apparaissent rouges sous contraste de phase en présence de bleu de méthylène. L'effet d'une impulsion germinative de 1 minute a aussi été étudié par cette technique : après un contact de 1 minute avec le germinant approprié (30 °C), la lame sur laquelle se trouvaient les spores était rincée et transférée au tampon PO<sub>4</sub> (30 °C) dans lequel elle demeurait pour des temps variables avant d'être séchée. L'évaluation du pourcentage de teinturabilité se faisait tel que décrit précédemment.

L'effet de l'irradiation UV sur l'engagement a été étudié au moyen de la teinturabilité. Les spores se trouvant sur des lames étaient maintenues dans le tampon PO<sub>4</sub> à 30 °C pendant 2 minutes avant de subir une irradiation. Le contact avec le milieu germinatif suivait cette irradiation. Après le contact avec le germinant, les spores étaient incubées dans le tampon pour 1 heure. Les conditions exactes de l'irradiation et de l'engagement sont indiquées dans la section résultats. L'irradiation des spores déposées sur une lame de verre afin de permettre l'évaluation subséquente de la teinturabilité est une technique n'ayant jamais été utilisée auparavant.

## 2.6-analyse des photoproduits

i) Marquage des spores. Les spores destinées à ces expériences étaient cultivées sur le milieu de sporulation décrit précédemment (Section 2.2). Ce dernier était toutefois supplémenté avec 2 µCi/ml de thymidine tritiée

(NEN, 83.7 Ci/mme). La thymidine radioactive en solution aqueuse stérile était ajoutée au milieu de culture immédiatement après que celui-ci soit sorti de l'autoclave. Les spores marquées étaient récoltées et purifiées tel que décrit à la section 2.2.

ii) Germination et irradiation. Un volume de 0.1 ml d'une suspension de ces spores ( $1.5 \times 10^9$  spores/ml) dans l'eau était déposé en monocouche sur une lame de microscope soigneusement lavée. Un cercle d'environ 2 cm de diamètre se formait. Les spores étaient par la suite séchées sous vide. L'engagement de la germination avait lieu en immergeant la lame dans un bécher contenant le milieu germinatif. De cette façon il était possible de faire des engagements par impulsion ou par contact continu avec le germinant de façon analogue à ce qui a été précédemment décrit pour les expériences de teinturabilité. Après un temps de germination variable, les spores étaient irradiées avec une fluence de 2400 J/m<sup>2</sup> (10 sec d'exposition à l'UV). Une courbe standard avait préalablement été établie en irradiant en présence de tampon phosphate les spores dormantes avec différentes fluences. Après l'irradiation, les spores étaient séchées sous vide. L'irradiation des spores déposées en monocouche permet d'atteindre une plus grande uniformité dans la fluence reçue par les cellules comparativement à la technique habituelle d'irradiation en milieu liquide (Powers & al. 1957)

iii) Hydrolyse. Un volume de 0.1 ml d'acide formique 88% était déposé sur le rond de spores séchées. Les spores étaient grattées et décollées de la lame au moyen d'une spatule métallique. Cette suspension de spores dans l'acide formique était transférée dans un tube de verre en insérant un coin

de la lame dans l'extrémité de ce tube. Une fois le tube scellé, l'hydrolyse était exécutée à 175 °C pendant 35 minutes (Stafford & Donnellan, 1968).

iv) Chromatographie. Environ 15 µl de l'hydrolysate était déposé avec une seringue Hamilton sur une couche mince en cellulose (Sigma) de 4 cm de largeur par 20 cm de longueur. Le dépôt se faisait à 1.5 cm de l'extrémité en une mince bande d'environ 1.5 mm x 10 mm (figure 13). Ceci se fait en déposant côte à côte de très petits volumes de l'échantillon et en séchant la bande de déposition dans un courant d'air chaud entre chaque application. La déposition en bande permettait de placer une quantité importante d'échantillon sur la couche mince et ainsi d'améliorer la limite de détection et de diminuer le niveau d'incertitude sans pour autant nuire à la résolution de la chromatographie, ce qui aurait sûrement été le cas si tout le matériel avait été déposé en un point unique. La chromatographie était exécutée dans le mélange n-butanol-acide acétique-eau (80:12:30) (Stahl, 1969) sur une longueur de 11 cm. La couche mince était par la suite découpée de la façon suivante (figure 13) : 1 cm était enlevé toute la longueur de chaque côté. La languette résultante (mesurant 2 cm de large) était découpée en bandes de 0.5 cm. Chacune de ces bandes était déposée au fond d'un flacon à scintillation et comptée pendant 5 minutes en phase hétérogène dans un compteur à scintillation (LKB Wallac, 1215). Le cocktail à scintillation était préparé en ajoutant 0.3 g de PPO et 5 g de POPOP à 1 litre de toluène (Stahl, 1969). Un volume de 3.5 ml de ce cocktail était utilisé dans chacun des flacons. Le chromatogramme était reconstitué en traçant le graphique %CPM versus le numéro de la bande. Chaque chromatogramme contenait entre 2500 et 5000 CPM au total. Le bruit de fond de comptage se chiffrait à environ 10 CPM. Dans ces

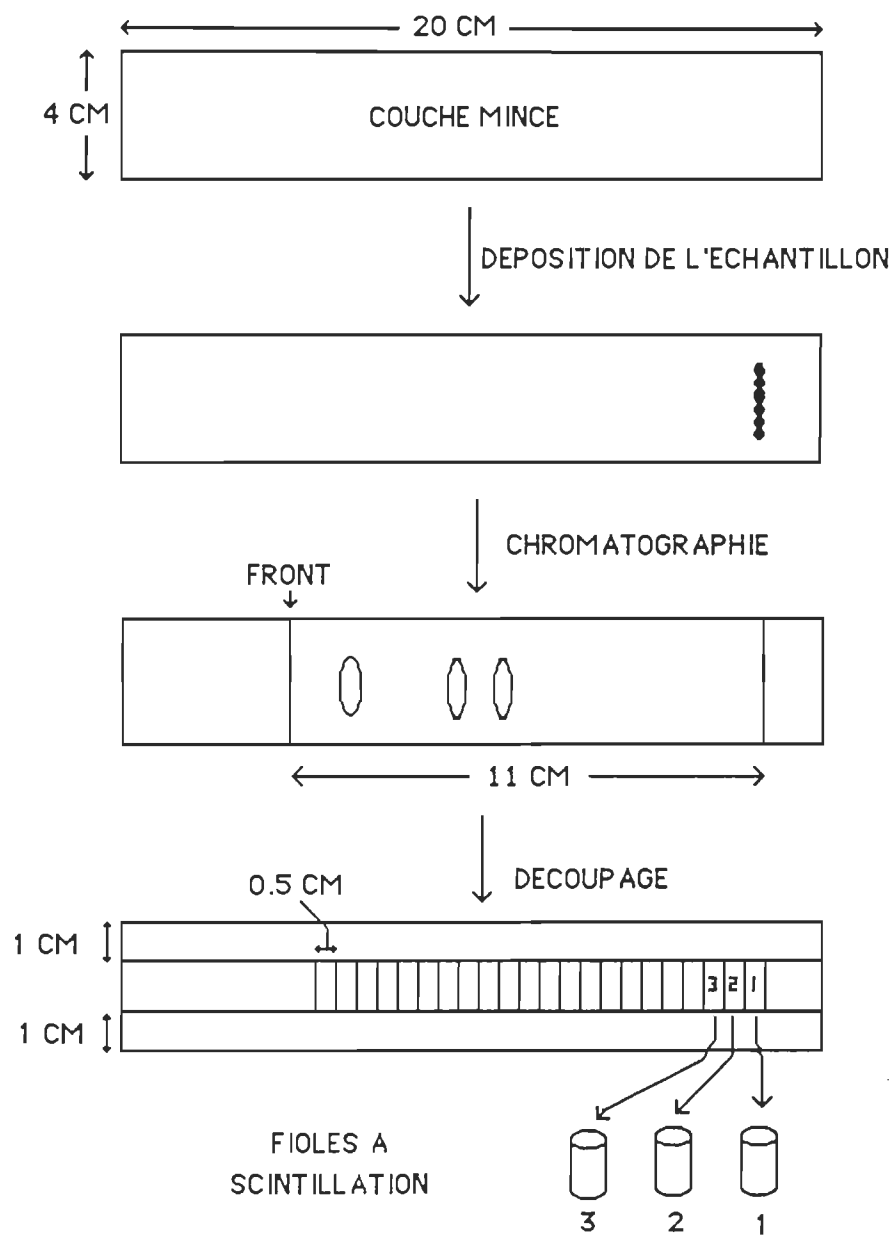


Figure 13. Séparation des dérivés de thymine par chromatographie.

conditions, les différents produits se retrouvaient à des positions hautement reproductibles : la thymine dans les bandes 14 ,15 et 16, le TDHT dans les bandes 11 et 12 et le dimère type cyclobutane (T-T) dans les bandes 9 et 10 (Voir la partie "résultats et discussion").



## CHAPITRE III

### RESULTATS ET DISCUSSION

#### 3.1 Intensité de la lampe

La figure 14 montre l'intensité UV (254 nm) de la lampe en fonction de la distance. Ces valeurs sont très reproductibles d'une expérience à l'autre et sont indépendantes du temps de fonctionnement après le réchauffement initial de 20 minutes de la lampe. Cette grande stabilité est due au contrôle de la température de la lampe et du voltage d'entrée. Des expériences préliminaires ont démontré que le contrôle de ces deux paramètres est essentiel pour tout travail quantitatif. La courbe de la figure 14 a été utilisée afin d'évaluer l'intensité UV à 6 cm, distance à laquelle tous les échantillons ont été irradiés pour le présent travail. Il était impossible de mesurer cette intensité directement car le radiomètre a une lecture maximale de  $200 \text{ W/m}^2$ . L'extrapolation de la courbe a permis d'évaluer à approximativement  $240 \text{ W/m}^2$  l'intensité à 6 cm de la lampe. La précision de de l'obturateur et la stabilité dans l'intensité de la lampe assurent que les échantillons reçoivent une fluence reproductible; la valeur absolue de cette fluence peut cependant être légèrement en erreur à cause de la détermination approximative de l'intensité. La connaissance de la valeur absolue exacte n'était toutefois pas importante dans le cadre de ce travail : seule la reproductibilité était essentielle.

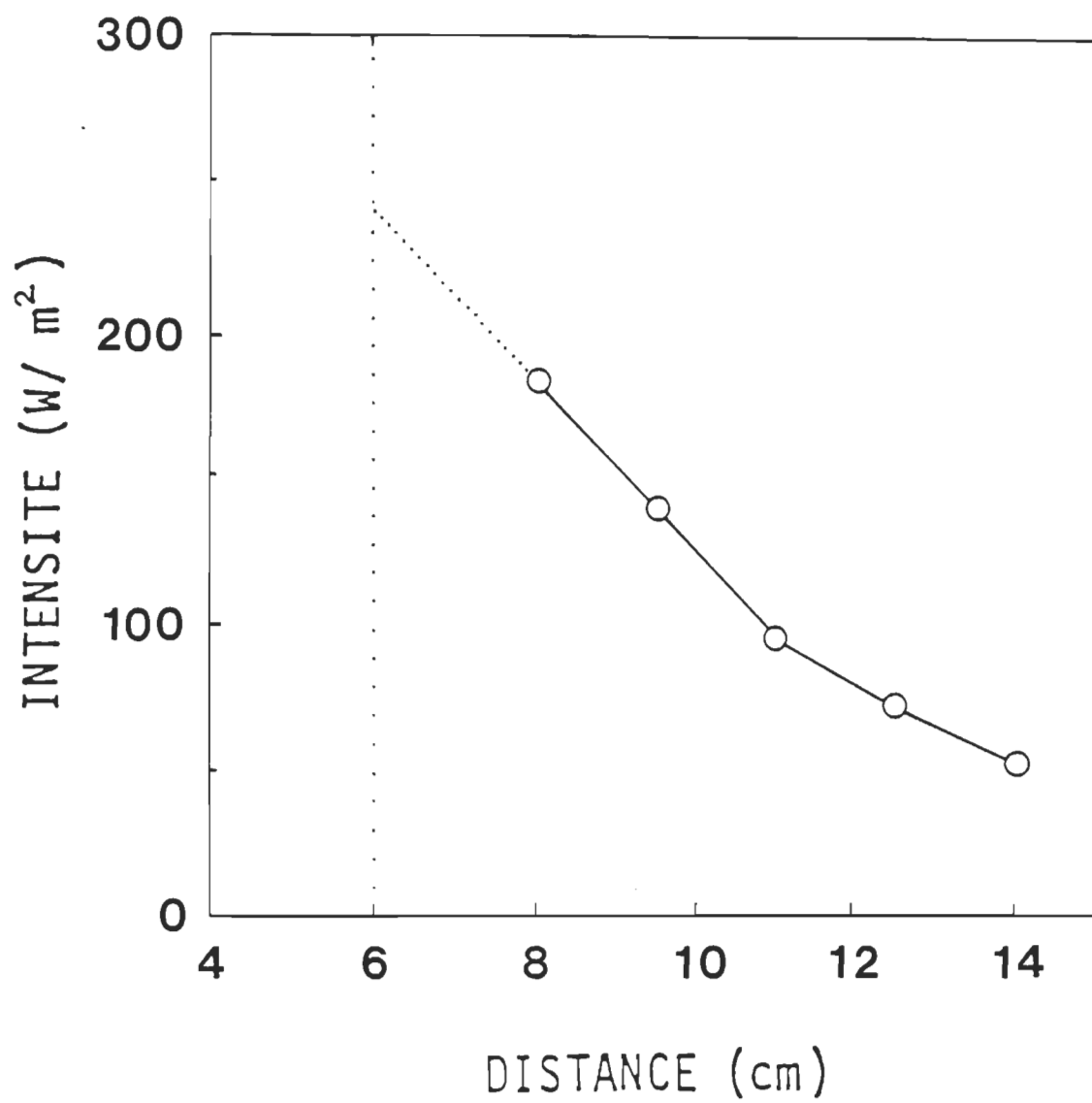


Figure 14. Intensité UV (254 nm) en fonction de la distance de la source.

### 3.2 Pic de résistance

La résistance à l'UV varie de façon importante pendant la germination. La figure 15 A montre la variation dans la résistance à l'UV en fonction du temps depuis le premier contact avec le germinant. Pour ces expériences, les filtres sur lesquels se trouvaient les spores étaient tout d'abord placés en contact avec le germinant pour 1 minute avant d'être rincés avec du tampon. Elles subissaient par la suite une maturation dans un milieu ne contenant aucun germinant jusqu'au moment de l'irradiation. Une fluence fixe de  $720 \text{ J/m}^2$  a été utilisée pour irradier les spores à différents temps de germination. Cette fluence permettait de mettre en évidence le pic de résistance à l'UV : pratiquement toutes les spores dans l'état résistant survivaient à cette dose alors que 99% des spores dormantes étaient tuées. A  $t = 5$  minutes, il y a beaucoup plus de survivants qu'à  $t = 0$  (spores irradiées avant tout contact avec le germinant) ou qu'à  $t = 30$  minutes. Initialement, l'échantillon n'est constitué que de spores dormantes (figure 15B). Les spores teinturables font leur apparition rapidement pour atteindre un plateau après environ 10 minutes depuis le premier contact avec le germinant. En tout temps, l'échantillon comprend un certain nombre de spores dormantes. Il est primordial de réaliser qu'en tout point de la figure 15A, la population la plus résistante de l'échantillon dominera la courbe. A  $t=5$  minutes, les spores dans l'état résistant (voir plus loin) sont donc responsables de la résistance observée, alors qu'à  $t=0$  et  $t=30$  minutes les spores dormantes sont dominantes. Conséquemment, même si à  $t=30$  minutes les spores germées sont en majorité, l'échantillon dans son ensemble montrera une résistance plutôt semblable à celle des spores dormantes. Un graphique

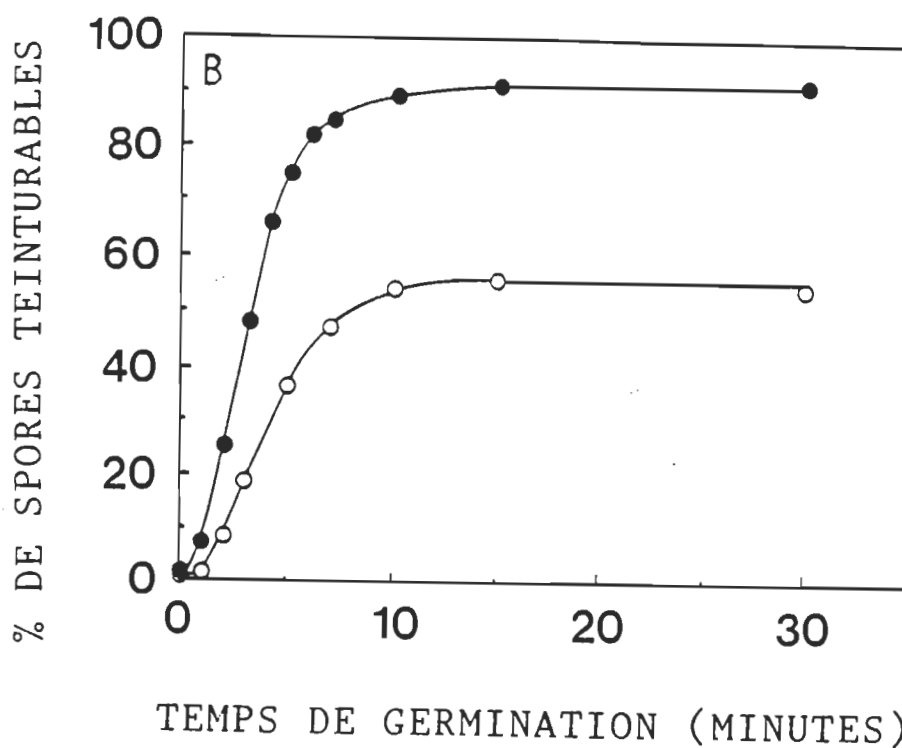
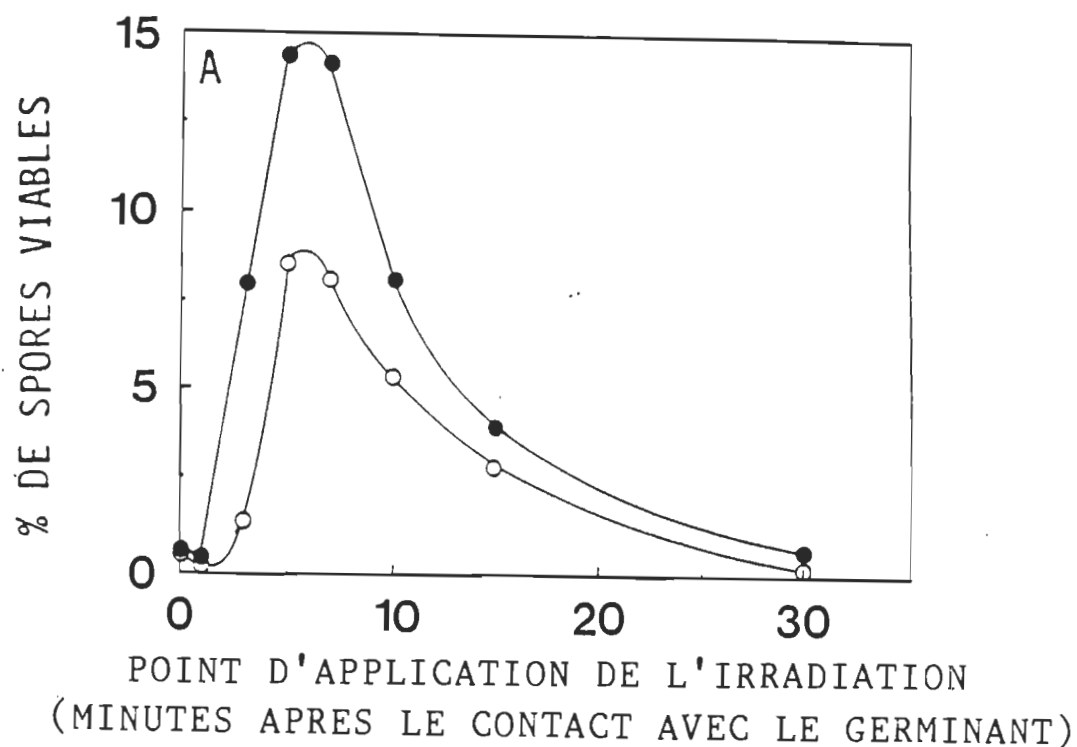


Figure 15. A- Pourcentage de viabilité après une irradiation UV ( $720 \text{ J/m}^2$ ) en fonction du temps de germination en absence (o) et présence (•) d'une activation par la chaleur ( $75^\circ\text{C}$ , 30 minutes) exécutée préalablement à l'engagement. B- Courbes correspondantes de teinturabilité vs temps de germination (sans irradiation).

effet-dose pour des spores dormantes et des spores ayant germées 5 minutes se trouve à la figure 16. Les données relatives aux spores dormantes indiquent, selon la théorie de la cible, que la mort d'une spore implique un mécanisme à coups multiples. Les spores ayant germées 5 minutes montrent un comportement biphasique caractéristique des échantillons contenant une population hétérogène du point de vue de la photosensibilité (figure 16). La section "haute dose" de cette courbe possède une pente presque nulle et représente la contribution des spores dans l'état hautement résistant. Une spore individuelle étant soit viable ou non-viable à une fluence donnée, le temps 5 minutes est donc le moment où le plus grand nombre de spores (environ 10%) se trouvent dans l'état de haute résistance. L'annexe I contient une formulation mathématique simple que j'ai développée afin de quantifier ce pic de résistance. En bref, cette formulation permet d'évaluer le temps moyen pendant lequel une spore individuelle demeure dans l'état hautement résistant (HR). Ce temps moyen dénoté  $\tau$ , dépend principalement de la surface sous le pic et de la proportion de spores qui germent :

$$\text{Surface} = [(N_{\text{germ}}/N_{\text{tot}}) P_r \tau] + [t P_{nr} \{1-(N_{\text{germ}}/N_{\text{tot}})\}] \quad (3.1)$$

où :  $N_{\text{germ}}$  = Nombre de spores qui germent  
 $N_{\text{tot}}$  = Nombre total de spores  
 $P_r$  = Probabilité qu'une spore dans  
l'état hautement résistant survive à la  
fluence utilisée

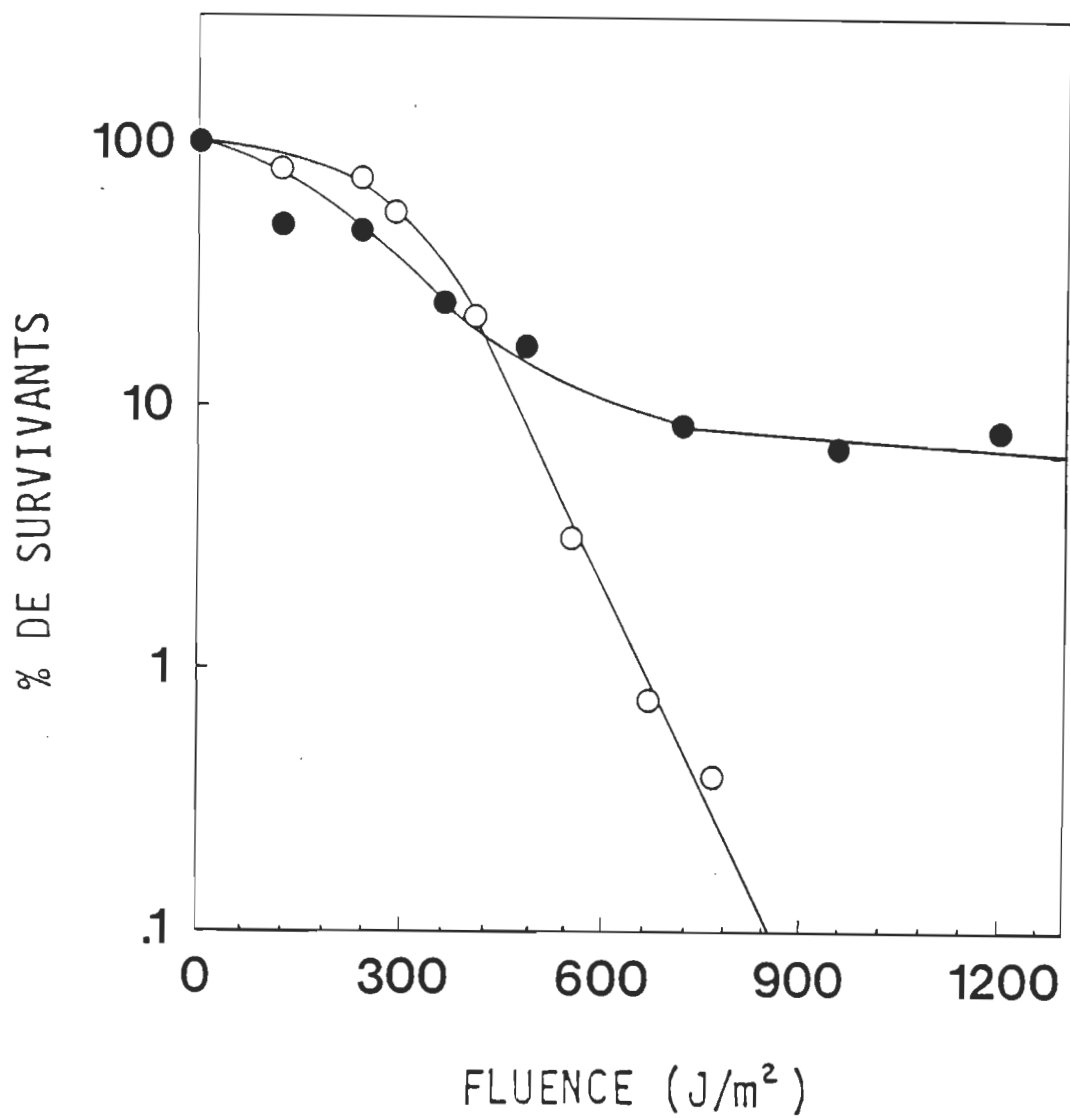


Figure 16. Courbes de viabilité (effet-dose) pour des spores à l'état de dormance (o) ou ayant germé 5 minutes à 30 °C dans le milieu de germination glucose 100mM, L-alanine 1mM et inosine 1mM (•).

$P_{nr}$  = Probabilité qu'une spore  
dormante survive à la fluence  
utilisée

$\tau$  = Durée moyenne de la haute  
résistance dans les spores de  
l'échantillon

$t$  = Temps sur lequel est effectuée  
l'étude

$(N_{germ}/N_{tot})$  peut être déterminé à partir des courbes de teinturabilité de la figure 15 B. Etant donné la technique utilisée, aucune spore supplémentaire ne pouvait être engagée après la première minute de germination. L'irradiation UV à différents temps après cette période initiale permettait donc d'observer la cinétique d'un nombre fixe de spores voyageant au travers les différentes étapes de la germination. Dans ces conditions,  $(N_{germ}/N_{tot})$  ne dépendait pas du temps d'irradiation. Ceci est évidemment essentiel pour l'applicabilité de l'équation (1). Le niveau final de teinturabilité à la figure 15 B représente le pourcentage total de spores engagées par l'impulsion de 1 minute de contact avec le germinant. La figure 16 permet de déterminer  $P_r$  et  $P_{nr}$  : la pente pratiquement nulle dans la région haute dose associée à l'état HR permet d'approximer la valeur  $P_r=1$  et, pour une dose de  $720 \text{ J/m}^2$ , 0.5% des spores dormantes survivent, donc  $P_{nr}=0.005$ .  $t$ , le temps total contribuant à la surface du pic, est égal à 30 minutes. Le pic de résistance a aussi été obtenu pour des spores ayant été activées à la chaleur ( $75^\circ\text{C}$ ) pendant 30 minutes (figure 15 A). L'activation résulte en la germination d'un plus grand nombre de spores tel qu'indiqué par les expériences de teinturabilité (figure 15 B).

L'activation augmente donc le rapport ( $N_{\text{germ}}/N_{\text{tot}}$ ). En utilisant les valeurs numériques données plus haut, la valeur  $\tau$  a été calculée pour des spores ayant subi ou non une activation (tableau 2). Ces résultats montrent que l'état hautement résistant durait en moyenne environ 95 secondes dans une spore et n'était pas affecté par l'activation. Le plus grand pic obtenu lorsqu'il y a activation n'est dû qu'à une plus grande quantité de spores y participant et non à une augmentation du temps HR dans les spores individuelles en germination. L'activation ne changeait pas la position du pic ( $t=5$  min.), indication que ce traitement avait peu d'effet sur la cinétique des événements subséquents à l'engagement lorsqu'observée au moyen de la phase HR comme marqueur. La normalisation des courbes de la figure 15 est une autre preuve que la cinétique de germination n'est pas affectée de façon appréciable par l'activation (figure 17). La normalisation permet de visualiser l'allure des pics obtenus si toutes les spores de l'échantillon germaient : ceci compense donc pour la différence dans la quantité de spores germant en présence et en absence d'activation. Les deux courbes obtenues sont pratiquement identiques. L'activation par la chaleur augmentait donc le nombre de spores participant à la germination sans pour autant affecter de façon importante la cinétique de germination des spores individuelles. Cette conclusion est en désaccord avec d'autres travaux indiquant que l'activation a aussi des effets post-engagements (Thibeault et Lefebvre, 1984). Il faut toutefois noter que ces travaux ont été effectués en utilisant la perte d'absorbance comme indice de la germination. Aussi longtemps que les relations entre les différents indices ne seront pas mieux connues, il sera difficile de comparer les résultats cinétiques obtenus en utilisant différents marqueurs.



CONDITIONS	SURFACE DU PIC (% MIN.)	% GERM.	t (SECONDES)
SANS ACTIVATION	EXP #1 : 90 EXP #2 : 100 EXP #3 : 70 MOYENNE = $87 \pm 12$	$55 \pm 2$	$95 \pm 15$
AVEC ACTIVATION	EXP #1 : 182 EXP #2 : 146 EXP #3 : 122 MOYENNE = $150 \pm 25$	$92 \pm 2$	$98 \pm 20$

Tableau 2. Durée moyenne de l'état de haute résistance chez une spore en germination .

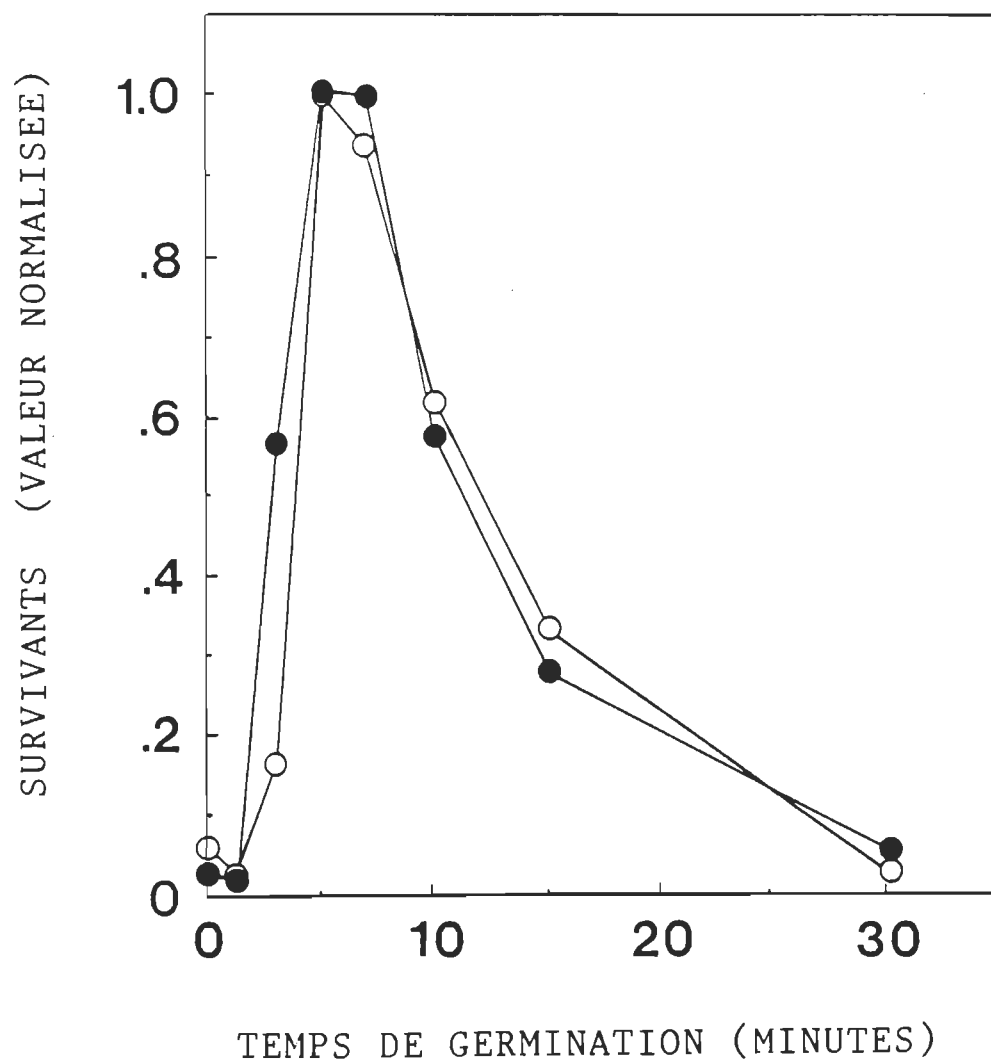


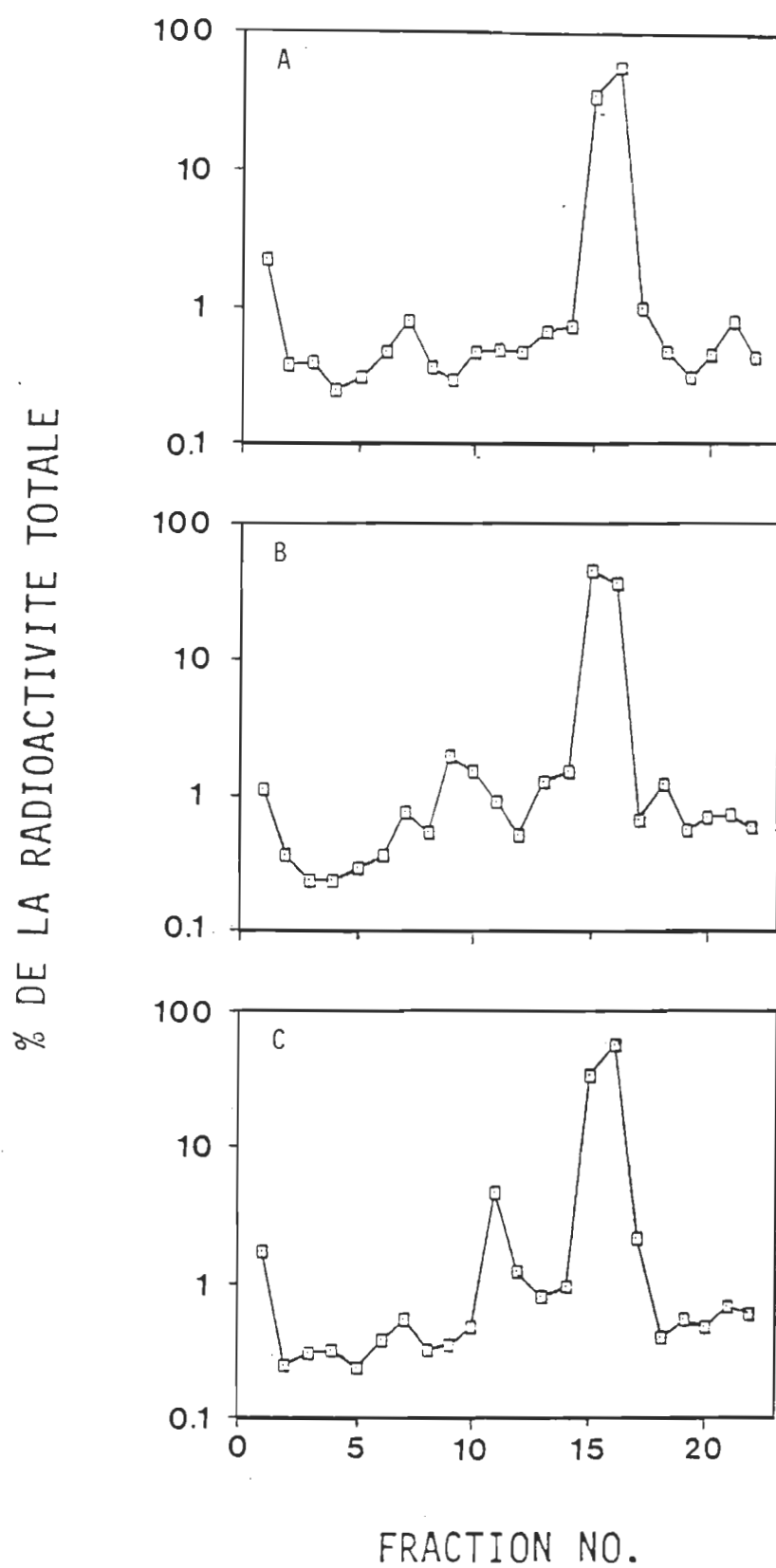
Figure 17. Normalisation des courbes de résistance à l'UV vs temps de germination pour des spores ayant subi (•) ou non (o) une activation à la chaleur. Les deux courbes ont été normalisées à 1.0 à leur maximum.

Cette formulation pour déterminer  $\tau$  requiert moins de suppositions que celle de Irie (1981) qui assumait l'apparition exponentielle de la phase HR après la perte de résistance à la chaleur.

### 3.3 Analyse des photoproduits

La méthode décrite à la section 2.6 a été mise au point afin de séparer et quantifier les photoproduits résultant de l'irradiation UV des spores bactériennes en germination. Un pic de TDHT, absent lorsqu'il n'y a pas d'irradiation, est facilement identifiable dans le chromatogramme correspondant aux spores irradiées (figure 18). Pour cette figure, le bruit de fond n'a pas été soustrait afin d'éviter le comportement en "dents de scie" que cela produirait pour les faibles valeurs de radioactivité sur une échelle logarithmique. Bien que la figure 18 soit utile pour visualiser les profils de radioactivité des chromatogrammes dans les différentes conditions, l'échelle logarithmique empêche de comparer l'importance relative des différents pics. Pour cette raison, les valeurs de radioactivité pour les différents produits sont incluses au tableau 3. Pour un chromatogramme de 11 cm de long, la radioactivité correspondant au TDHT se retrouvait donc de façon reproductible dans les fractions 11 et 12. La figure 19 montre la radioactivité dans ces fractions en fonction de la fluence utilisée pour des spores dormantes. Au début de la courbe, la quantité de dimères produits était une fonction linéaire de la fluence. On peut attribuer la courbure aux plus fortes fluences à un effet de saturation : les thymines adjacentes intactes pouvant être transformées en dimères deviennent de plus en plus rares. L'irradiation de spores germées produisait un photoproduit différent associé aux fractions 8 et 9

Figure 18. La distribution de la radioactivité sur les chromatogrammes de spores hydrolysées. A, Spores n'ayant subi aucune irradiation. B, Spores ayant été irradiées ( $2.4 \text{ kJ/m}^2$ ) après 30 minutes de germination à  $30^\circ\text{C}$ . C, Spores dormantes irradiées ( $2.4 \text{ kJ/m}^2$ ).



	‰ DE RADIOACT. DANS LES FRACTIONS 9 ET 10	‰ DE RADIOACT. DANS LES FRACTIONS 11 ET 12	‰ DE RADIOACT. DANS LES FRACTIONS 14,15, ET 16.
SPORES DORMANTES	0.66 ‰	0.88 ‰	90.1 ‰
SPORES DORM. IRRADIEES	0.75 ‰	5.04 ‰	89.8 ‰
SPORES GERM. IRRADIEES	3.45 ‰	1.53 ‰	91.4 ‰

Tableau 3. Distribution de la radioactivité dans les chromatogrammes de la figure 13.

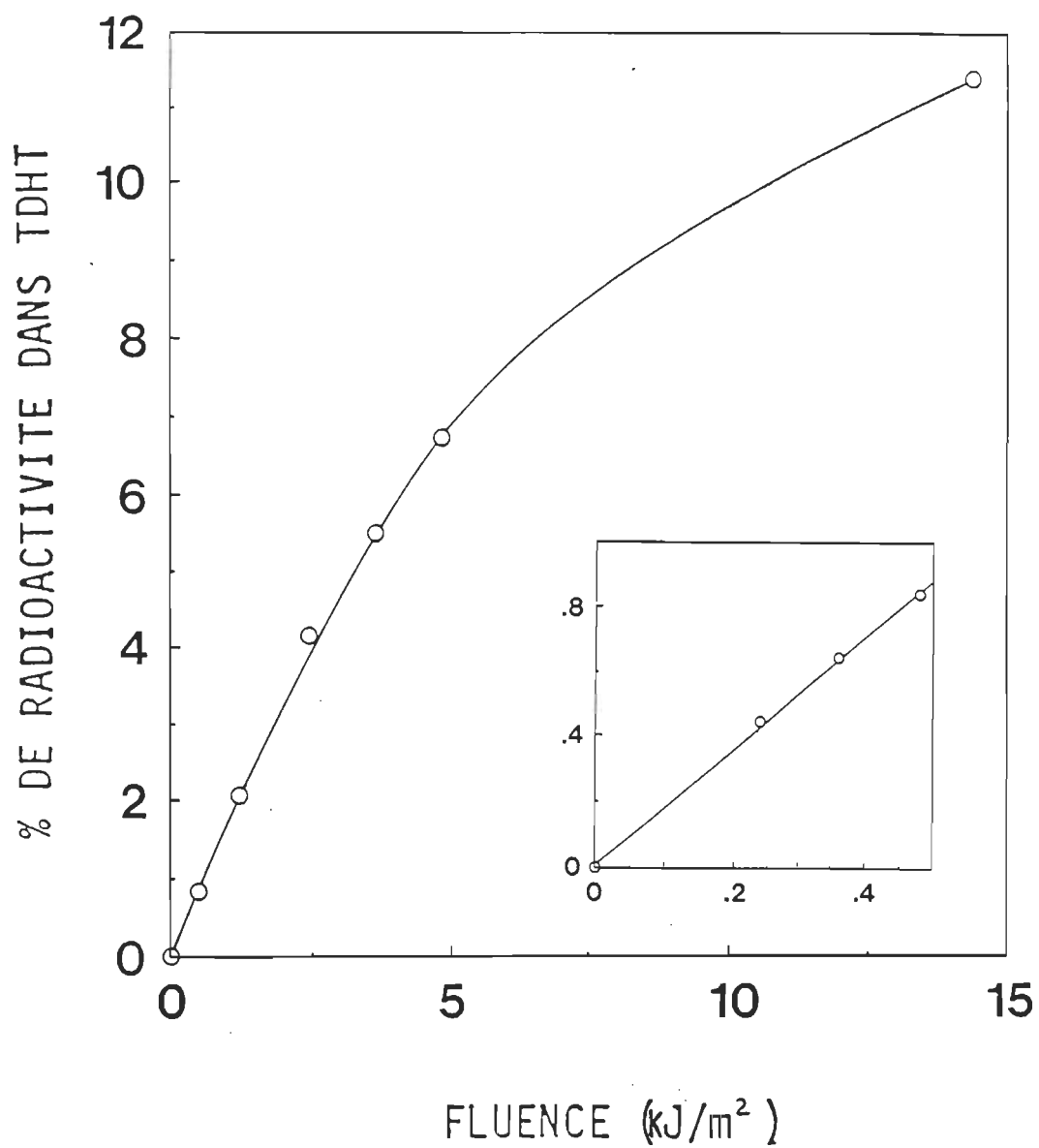


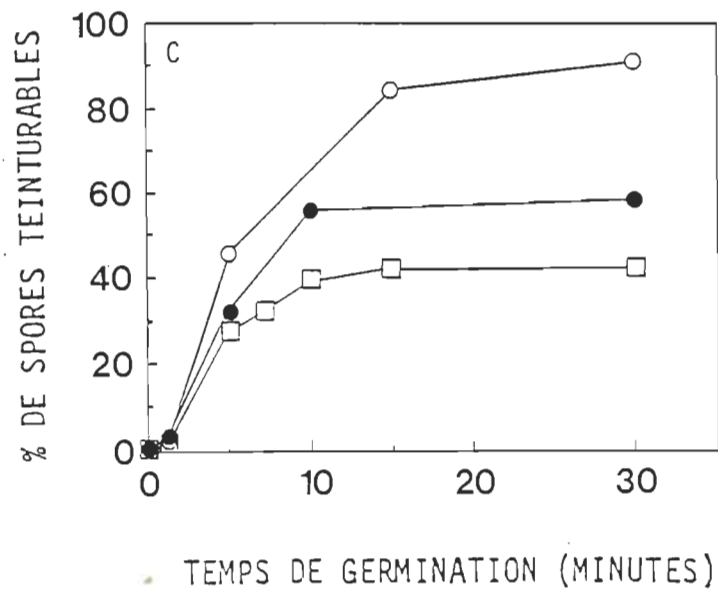
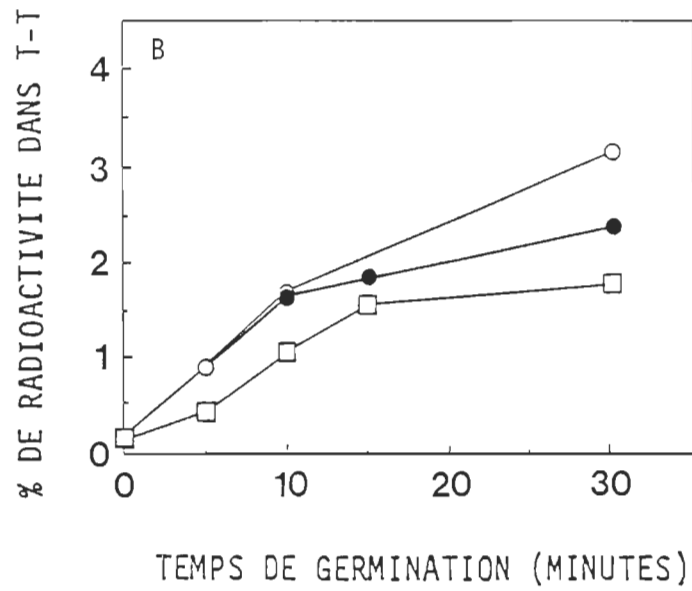
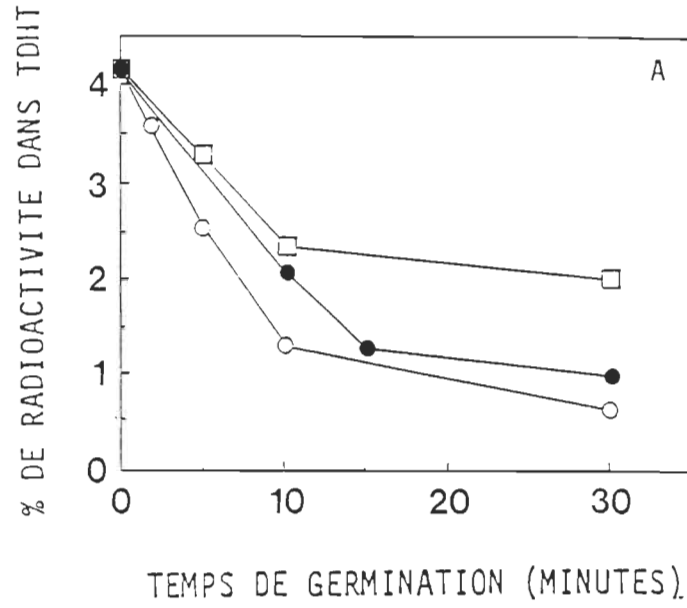
Figure 19. Radioactivité dans le pic de TDHT pour des spores dormantes en fonction de la fluence UV. Encart : *Idem* à faible fluence.

du chromatogramme (figure 18 B). Ce photoproduit correspond au conventionnel dimère de thymine retrouvé généralement dans les cellules irradiées. Cette transition dans le type de photoproduits résultant de l'irradiation indique un changement dans l'environnement et/ou la conformation de l'ADN. Pendant la germination, la spore transforme ses structures et son environnement pour acquérir sa forme végétative et ceci se reflète par un changement graduel des photoproduits.

Ce phénomène, intéressant en soi, peut aussi servir pour étudier la cinétique de germination. La figure 20 représente la quantité de photoproduits de type spore (A) et végétatif (B) en fonction du temps de germination pour différentes conditions de germination. La fluence utilisée pour ces expériences ( $2400 \text{ J/m}^2$ ) était plus élevée que celle utilisée pour les expériences de viabilité afin de permettre la formation d'une quantité suffisante de photoproduits et ainsi améliorer le rapport signal/bruit. Cette approche est inspirée de celle de Wang & Rupert (1977). Les spores étaient hydrolysées moins de 5 minutes après l'irradiation afin de s'assurer qu'aucun mécanisme de réparation de l'ADN n'ait le temps d'agir sur les photoproduits formées. Wang & Rupert (1977) ont montré que les mécanismes de réparation dans la spore en germination agissent sur une échelle de temps beaucoup plus longue. La partie C de la figure sert de contrôle et démontre l'étendue de la germination dans les mêmes conditions tel que révélé par la technique de la teinturabilité. La teinturabilité est un marqueur ponctuel de la germination : une spore est soit teinturable, soit non-teinturable. Ceci n'est pas le cas cependant pour la formation des photoproduits. Le changement dans la quantité de photoproduits formés dans une spore individuelle en germination pourrait



Figure 20. Cinétique de germination. Quantité de TDHT (A) ou T-T (B) formée par l'irradiation UV en fonction du temps de germination. C. Pourcentage de spores teinturables en fonction du temps de germination à 30 °C. Pour les trois graphiques : o, milieu de germination A en contact continu jusqu'à l'irradiation. ●, impulsion de 1 minute de contact avec le milieu GLI-100 suivie d'une période de maturation pour compléter le temps indiqué. □, impulsion de 1 minute avec le milieu de germination G-100.



être graduel. Les courbes de teinturabilité sont toutes sigmoïdes dans les conditions de germination utilisées (figure 20 C). Ceci indique que la teinturabilité est un évènement relativement tardif de la germination car les cinétiques d'engagement sont exponentielles (figure 23). La faible vitesse d'arrivée à la teinturabilité au début de la courbe est donc due au temps que prennent les spores engagées pour atteindre cet évènement. L'absence apparente de temps de latence dans les courbes de la figure 20 A suggère que la diminution dans la quantité de TDHT formée est un évènement s'amorçant plus tôt que l'acquisition de la teinturabilité chez les spores de *Bacillus megaterium* en germination. Pour des raisons de sensibilité, cette absence de temps de latence est particulièrement visible pour la courbe de la figure 20 A correspondant au plus fort pourcentage de germination (le point  $t=1.5$  minute est présent). Pour chacune des conditions de germination, la pente initiale dans la courbe de dimères de thymine type cyclobutane (T-T) vs temps de germination (figure 20 B) est beaucoup plus faible que la pente correspondante pour le TDHT (figure 20 A), même si le changement total est approximativement identique. Ceci indique que l'apparition de T-T est un phénomène légèrement plus tardif que la disparition du TDHT, suggérant une phase transitoire pendant laquelle l'ADN est moins sensible aux UV. Cette conclusion est en accord avec celle de Stafford & Donnellan (1968) qui attribuaient la phase de haute résistance à une période transitoire de faible réactivité de l'ADN. Des travaux génétiques récents (Setlow & Setlow, 1988) abondent dans le même sens et impliquent les SASP's dans la période faiblement réactive de l'ADN. Les résultats obtenus dans le cadre de ce travail de maîtrise tout comme ceux de Stafford & Donnellan ne permettent cependant pas de supporter cette conclusion de façon

définitive étant donné l'hétérogénéité de l'échantillon. L' hétérogénéité est sans doute le facteur le plus important à considérer lors de l'examen des courbes de la figure 20. A  $t=5$  minutes (pic de résistance), plus de 85 % des spores ne sont pas dans l'état HR (figure 15). Même si les spores à l'état résistant avaient un niveau de photoproduit nul, on ne verrait pas de façon évidente une absence de photoproduits sur les courbes de la figure 20. Tel que décrit plus haut, l'analyse doit donc être effectuée avec une approche cinétique. Wang & Rupert (1977) avaient proposé un mécanisme de réparation spécifique pour expliquer la phase de haute résistance dans *Bacillus subtilis* qui ne démontrait apparemment aucune période de faible réactivité de son ADN. Ces auteurs utilisaient cependant une lampe UV de faible intensité demandant des temps d'irradiation très longs (60-100 sec). Pour ce faire ils bloquaient la germination en refroidissant rapidement les spores à 4°C avant l'irradiation. Il est possible que ce blocage n'était pas parfait et que l'état de faible réactivité ait été masqué par un temps d'irradiation trop long par rapport à la durée de cet état. Les spores de *Bacillus megaterium* utilisées pour mon travail démontraient une durée de HR d'environ 95 secondes (Section 3.2). Toute irradiation plus longue que cette période n'aurait pas permis d'observer la période de faible réactivité de l'ADN par manque de résolution.

La figure 21 compare les courbes de production de TDHT et de résistance à la chaleur en fonction du temps de germination. La résistance à la chaleur a été évaluée en étudiant la capacité des spores de former des colonies après une exposition à la chaleur (75 °C pour 10 minutes) à différents temps de germination. La perte de résistance à la chaleur, reconnue comme le premier événement détectable lors de la germination

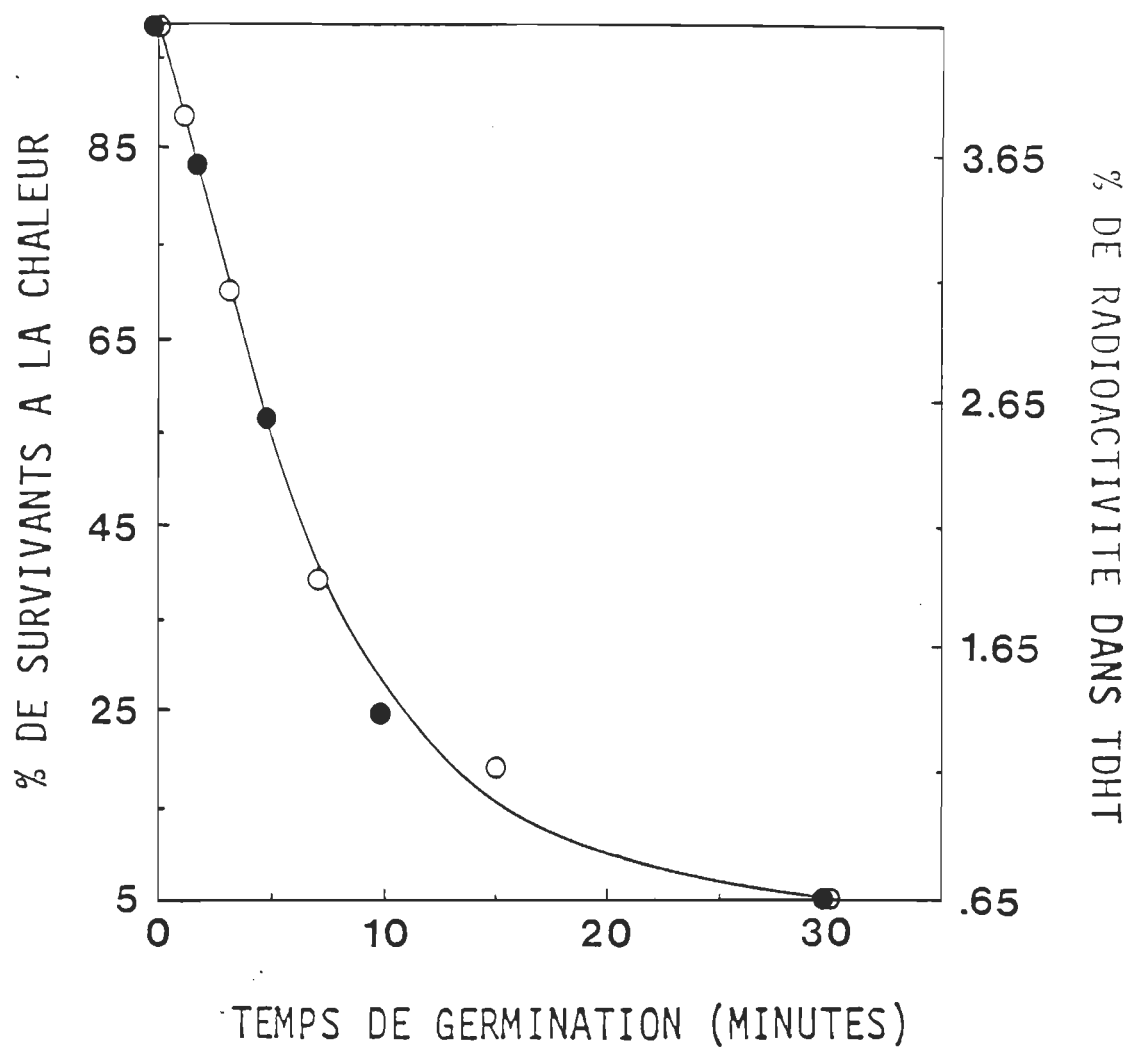


Figure 21. Comparaison des courbes % de radioactivité dans le pic de TDHT (•) et % de survie à la chaleur (75 °C) (o) en fonction du temps de germination.

(Stewart & al.,1981), démontre une cinétique analogue à celle de la perte de formation de TDHT. Ceci confirme le fait énoncé plus haut que cet évènement se situe très tôt dans la séquence germinative. La disparition de la capacité à former du TDHT, évènement n'ayant jamais été utilisé pour des études cinétiques, pourrait donc devenir un indice très utile.

### 3.4 Effet de l'irradiation pré-engagement sur la germination.

Pour cette partie du travail, les spores furent tout d'abord exposées à l'UV et ensuite testées pour leur capacité germinative. Une telle expérimentation permet de mettre en évidence l'effet de l'UV sur la "machine" protéique impliquée dans la germination. Généralement, la fluence nécessaire pour diminuer de façon mesurable le niveau de germination est environ 10 fois plus élevée que dans le cas des études de viabilité. Ceci reflète bien la différence dans la taille des cibles impliquées : ADN (viabilité) et protéines (germination). Pour ces expériences seul l'effet sur la germination a été étudié. La viabilité, phénomène beaucoup plus tardif impliquant la réplication de l'ADN et l'expression d'un grand nombre de gènes, serait extrêmement faible pour de telles fluences. La figure 22 illustre l'effet de l'UV sur le pourcentage de spores engagées par un contact subséquent de 10 minutes avec le germinant. Lorsque le glucose était utilisé comme seul germinant, la décroissance de la capacité de germination des spores était linéaire en fonction de la fluence UV. La présence simultanée de la L-alanine avec le glucose affectait beaucoup cette courbe : le pourcentage de germination

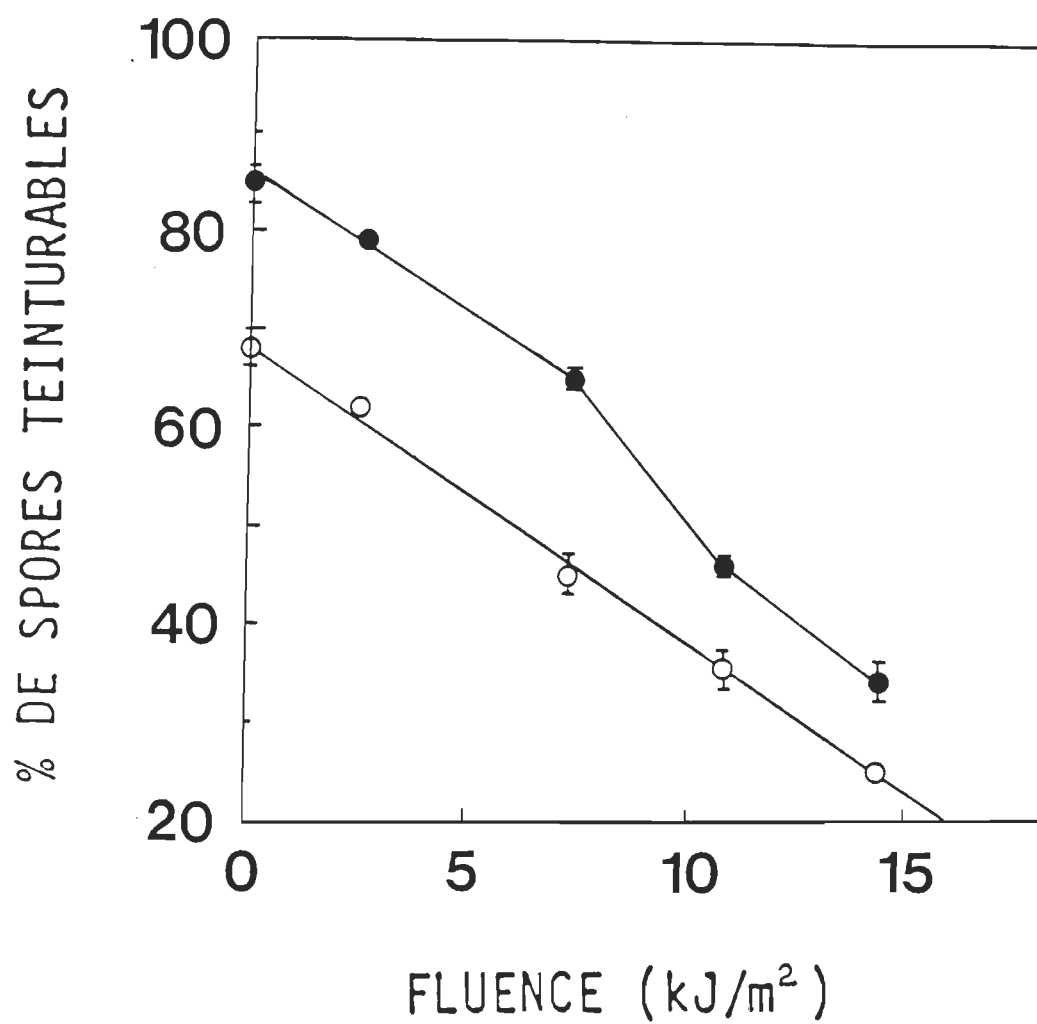


Figure 22. Effet de l'irradiation pré-engagement sur le pourcentage de spores engagées par 10 minutes de contact avec le germinant. o, milieu de germination G-100. •, milieu de germination G-100 + L-alanine.

était plus élevé et la linéarité était perdue. Ces résultats suggèrent que la L-alanine et le glucose interagissent à des sites différents n'ayant pas la même sensibilité aux UV. La L-alanine permettait une augmentation d'environ 20% dans la germination lorsqu'elle était ajoutée au glucose en absence d'irradiation (68%--->86%; voir figure 22). Une irradiation de 30 secondes (7.2 kJ/m<sup>2</sup>) diminuait du tiers le nombre de spores engageables par le glucose seul (68%---> 45%) mais laissait intact le nombre de spores engageables en surplus par la L-alanine (20%). Une telle irradiation endommageait donc sérieusement l'engagement par le glucose mais n'affectait pas le travail de la L-alanine. Le site de la L-alanine apparaissait moins sensible aux UV que celui du glucose. De plus, lorsque les deux courbes sont normalisées, celle correspondant au glucose seul possède la pente la plus forte, indiquant encore une fois la sensibilité moindre du site de la L-alanine comparativement à celui du glucose. Tout ceci est en accord avec des études génétiques (Irie & al., 1982b), de compétition (Yasuda & Tochikubo, 1984) et de dépendance de l'engagement sur le pH (Morin & al., 1990) suggérant des sites différents d'interaction pour ces deux germinants.

Dans le but de mieux comprendre le mécanisme de l'engagement et de l'inactivation de ce dernier, une étude cinétique a été entreprise. La figure 23 montre la cinétique d'engagement dans 100 mM (A) et 2.5 mM (B) glucose avec ou sans irradiation pré-engagement à 9.6 kJ/m<sup>2</sup>. Ces courbes ont été obtenues en exposant les spores (irradiées ou non) au germinant pour les temps indiqués. Ce traitement était suivi d'une période de maturation d'une heure dans le tampon afin de s'assurer que toutes les spores engagées avaient atteint le marqueur utilisé : la teinturabilité.



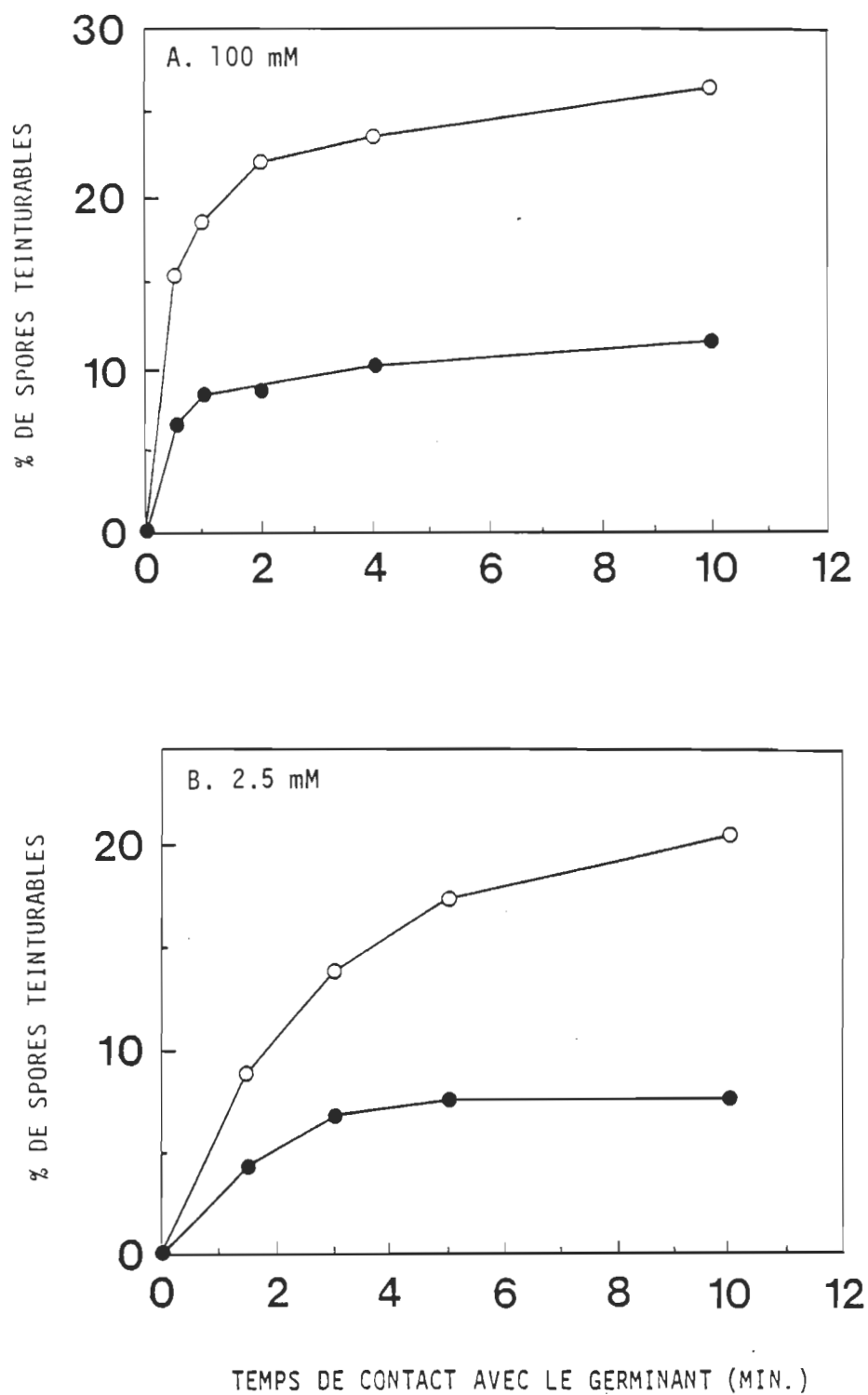


Figure 23. Pourcentage de spores engagées par un contact au glucose à 100 mM ou 2.5 mM pour les temps indiqués avec (•) ou sans (o) irradiation pré-engagement.

L'effet de l'irradiation se reflète tant au niveau de la vitesse initiale qu'au niveau du pourcentage final de germination. L'examen de ces figures nous indique aussi que la concentration de glucose a un effet important sur ces deux paramètres. La répétition de ces expériences pour plusieurs concentrations en glucose a permis de construire un graphe de Lineweaver-Burk (figure 24). La courbe obtenue en absence d'irradiation démontrait une linéarité typique d'une cinétique de Michaelis-Menten avec un  $K_m=12$  mM et un  $V_m=30\%$ /minutes. Venkatasubramanian & Johnstone (1989) avaient eux aussi trouvé une relation linéaire sur un graphe de Lineweaver-Burk pour l'engagement chez *Bacillus subtilis*. Les valeurs de  $K_m$  obtenues à partir de ces courbes n'ont aucune signification claire. Plusieurs événements sont sans doute impliqués entre le moment où la spore interagit avec le glucose et le moment où la spore devient teinturable (Foster & Johnstone, 1990). L'irradiation pré-engagement influence de façon importante l'allure de cette courbe. En présence d'irradiation la courbe est surélevée, indiquant clairement une inhibition de la germination à toutes les concentrations étudiées. Le nombre de points sur la courbe ne permet pas de déterminer s'il s'agit toujours d'une relation linéaire (avec un  $K_m = 3.9$  mM) ou si le comportement est maintenant biphasique (en pointillé sur la figure 24). Une courbe biphasique suggérerait que les récepteurs du glucose sont hétérogènes dans leur réponse à l'UV. Une meilleure définition de cette courbe est essentielle avant de pouvoir tirer toute conclusion à ce sujet.

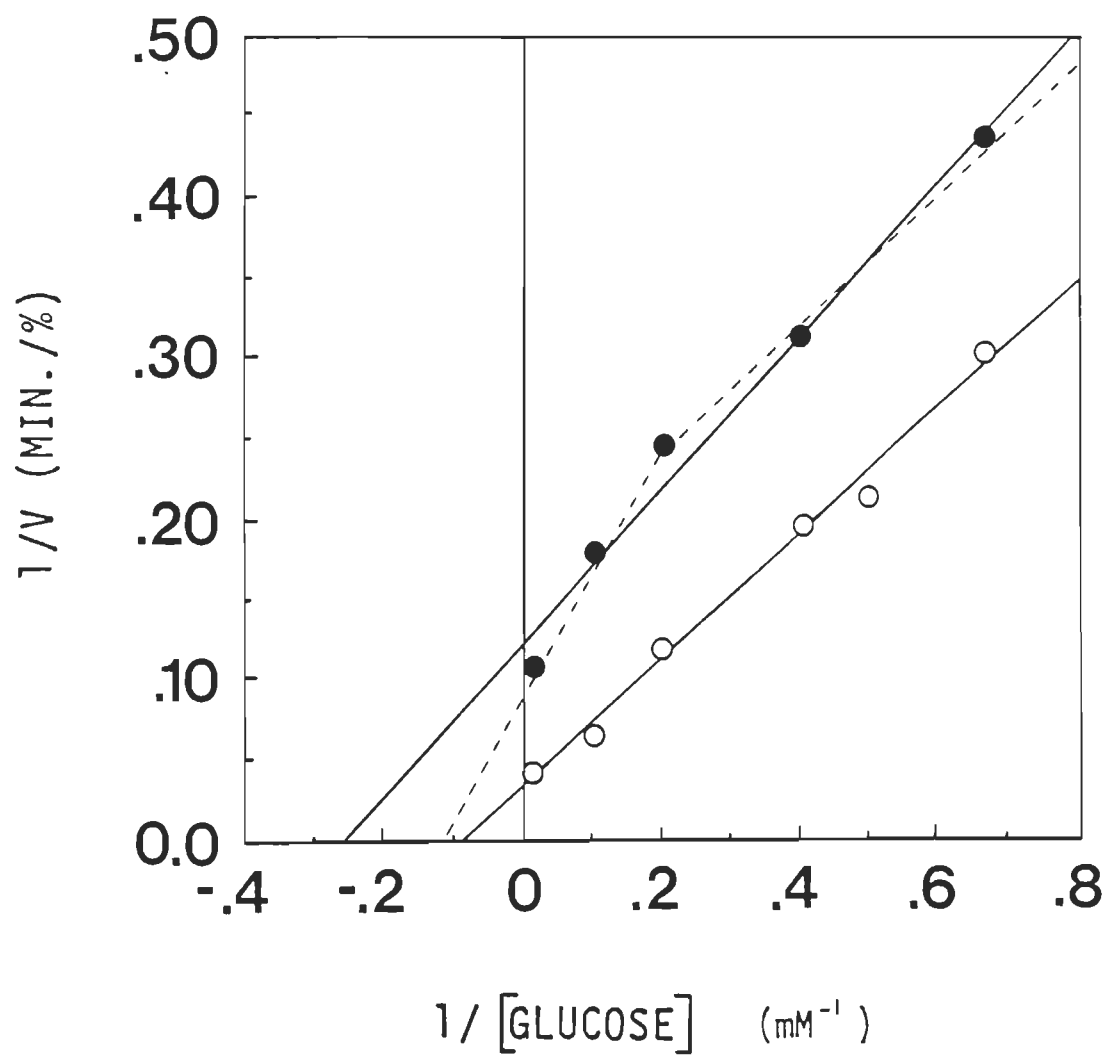


Figure 24. Courbes de Lineweaver-Burk obtenues en présence (•) ou absence (o) d'irradiation pré-engagement.

## CHAPITRE IV

### CONCLUSIONS

Le montage spécial de la lampe UV ainsi que plusieurs techniques ont été mis au point expressément pour ce projet. La forte intensité de la lampe a permis la réalisation d'études cinétiques à haute résolution. Ces dernières ont démontré que la phase transitoire de haute résistance est concomitante à une faible production de photoproduit dans l'ADN. De plus, l'étude de l'effet de l'inactivation pré-engagement sur la cinétique de l'engagement a contribué à mettre en évidence des sites d'interaction différents pour la L-alanine et le glucose. Il est clair, à partir de ces résultats, que l'inactivation UV de systèmes biologiques peut permettre dans certains cas une meilleure compréhension du fonctionnement normal de ces derniers. Le manque de spécificité ainsi que la nature aléatoire de l'interaction de la radiation avec la matière sont cependant des problèmes majeurs et incontournables de cette technique.

## REFERENCES

- Alderton,G. & Snell,N. 1963. Base exchange and heat resistance in bacterial spores. Biochem. Biophys. Res. Comm. **10**, 139-143
- Altman,R.L. & Benson,S.W. 1960. The effect of water upon the rate of heat denaturation of egg albumin. J. Am. Chem. Soc. **82**, 3852-3857
- Aronson,A.I. & Fitz-James,P.C. 1975. Properties of *Bacillus cereus* spore coat mutants. J. Bacteriol. **123**, 354
- Aronson,A.I. & Fitz-James,P.C. 1976. Structure and morphogenesis of the bacterial spore coat. Bacteriol. Rev. **40**, 2, 360-402
- Aronson,A.I. & Horn,D. 1972. Characterization of the spore coat protein of *Bacillus cereus* T.In "Spore V". p.19-27. American Society for Microbiology. (Halvorson,H.O., Hanson,R. & Campbell, L.L. Eds) Washington,DC
- Ascenzi,J.M. & Jagger,J. 1979. Ultraviolet action spectrum (238-405 nm) for inhibition of glycine uptake in *E. coli*. Photochem. Photobiol. **30**, 661-666
- Augenstein,L & Riley,P. 1964. The inactivation of enzymes by ultraviolet light-IV. The nature and involvement of cystine disruption. Photochem. Photobiol. **3**, 353-367

Calvert,J.G. & Pitts,J.N. 1966. Photochemistry. John Wiley & Sons. New-York, 899 p.

Crosby,W.H., Greene,R.A. & Slepecky,R.A. 1971. In "Spore Research". 143-160. (A.N. Barker, G.W. Gould & J. Wolf Eds.). Academic Press. London.

Donnellan,J.E. & Setlow,R.B. 1965. Thymine photoproducts but not thymine dimers found in ultraviolet irradiated bacterial spores. Science. **149**, 308-310

Feavers,I.M., Miles,J.S. & Moir,A. 1985. The nucleotide sequence of a spore germination gene (ger A) of *Bacillus subtilis* 168. Gene. **38**, 95-102

Fitz-James,P.C. 1971. Formation of protoplasts from resting spores. J. Bacteriol. **105**, 1119-1136

Fitz-James,P.C. & Young,I.E. 1969. Morphology of sporulation. In "The bacterial spore" (Gould,G.W. & Hurst,A. Ed.) 39-72. Academic Press. New-York

Foster,S.J. & Johnstone,K. 1986. The use of inhibitors to identify early events during *Bacillus megaterium* KM spore germination. Biochem. J. **237**, 865-870

Foster,S.J. & Johnstone,K. 1987. Purification and properties of a germination specific cortex-lytic enzyme from spores of *Bacillus megaterium* KM. Biochem. J. **242**, 573-579

Foster,S.J. & Johnstone,K. 1990. Pulling the trigger : the mechanism of bacterial spore germination. Molec. Microbiol. **4** (1),137-141.

Gates,F.L.1930. A study of the bactericidal action of UV light. III. The absorption of ultraviolet light by bacteria. J. Gen Physiol. **14**, 31-42

Greer,S. 1960. Studies on ultraviolet irradiation of *Escherichia coli* containing 5-bromouracil in its DNA. J. Gen. Microbiol. **22**, 618-634

Hashimoto,T., Friebe,W.R. & Conti,S.F. 1969. Germination of single bacterial spores. J. Bacteriol. **98**, 1011

Harrel,W.K. & Halvorson,H. 1955. Studies on the role of L-alanine in the germination of spores of *Bacillus terminalis* . J. Bacteriol. **69**, 275

Haynes, R.H. 1964. Molecular localization of radiation damage relevant to bacterial inactivation. p. 51-72 in "International Conference on physical processes in radiation biology. Academic Press Inc. New-York.

Irie,R., Okamoto,T. & Fujita,Y. 1982a. Estimation of photoproduct formation in germinating spores of *Bacillus subtilis* . Photochem. Photobiol. **35**, 783-787

Irie,R., Okamoto,T. & Fujita,Y. 1982b. A germination of a mutant of *Bacillus subtilis* deficient in response to glucose. J. Gen. Appl. Microbiol. **28**, 345-354

Irie,R., Okamoto,T. & Fujita,Y. 1984. Kinetics of spore germination of *Bacillus subtilis* in low concentrations of L-alanine. J. Gen. Appl. Microbiol. **30**, 109-113

Irie,R., Yano,N. & Kembo,H. 1986. Kinetic analysis of the UV-resistant transient stage in spore germination of *Bacillus subtilis*. J. Gen. Appl. Microbiol. **14**, 279-293

Jagger,J. 1967. Introduction to research in ultraviolet photobiology. Prentice-Hall inc. Englewood Cliffs, NJ. 164 p.

Johnstone,K., Stewart,G.S.A.B., Scott,I.R. & Ellar, D.J. 1982. Zinc release and the sequence of biochemical events during triggering of *Bacillus megaterium* KM spore germination. Biochem. J. **208**, 407-411

Kadota,H., Iijima,K & Uchida,A. 1965. The presence of keratinlike substance in spore coat of *Bacillus subtilis* . Agric. Biol. Chem. **29**, 870-875

Keynan,A. 1978. in "Spores VII" (Chambliss,G. & Vary, J.C. Eds.) American Society for Microbiology, Washington DC., 43-53

Kornberg,A. 1989. Never a dull enzyme. Ann. Rev. Biochem. **58**, 1-30

Leblanc,R. & Lefebvre,G.M. 1984. A stochastic model of bacterial spore germination. Bull. Math. Biol. **46**, 447-460



Lefebvre, G.M. (1978). The time dependence of bacterial spore germination. J. Theor. Biol. **75**, 307-319

Lefebvre, G.M. & Antippa, A.F. 1982. The kinetics of germination in bacterial spores. J. Theor. Biol. **95**, 489-515

Levinson, H.S. & Hyatt, M.T. 1966. Sequence of events during *Bacillus megaterium* spore germination. J. Bacteriol. **91**, 1811-1818

Mason, J.M. & Setlow, P. 1986. Essential role of small, acid soluble spore proteins in resistance of *Bacillus subtilis* spores to UV light. J. Bacteriol. **167**, 174-178

McLaren, A.D. & Shugar, D. 1964. Photochemistry of proteins and nucleic acids. Pergamon Press, Long Island city, New-York.

Moir, A. 1981. Germination properties of a spore coat defective mutant of *Bacillus subtilis* 168. J. Bacteriol. **146**, 1106-1116

Moir, A., Lafferty, E. & Smith, D.A. 1979. Genetic analysis of spore germination mutants of *Bacillus subtilis* 168 : The correlation of phenotype with map location. J. Gen. Microbiol. **111**, 165-180

Moir, A. & Smith, D.A. 1985. The genetics of spore germination of *Bacillus subtilis* . In "Fundamental and applied aspects of spores" (Dring, Ellar & Gould Eds.) 89-100, Academic Press, London.

Morin,P., Bédard,J. & Lefebvre,G.M. 1990. Certain aspects of the pH dependence of triggering in *Bacillus megaterium* spores. Curr. Microbiol. **21** (Sous presse)

Morin,P. & Lefebvre, G.M. 1989. Augmentation transitoire de la résistance à l'UV chez *Bacillus megaterium* 14581. 54 ~~eme~~ congrès de l'ACFAS. Montréal.

Patrick,M.H. & Gray,D.M. 1976. Independence of photoproduct formation on DNA conformation. Photochem. Photobiol. **24**, 507-513.

Powers, E.L., Ehret, C.F. & Bannon, A. 1957. The membrane filter technique in radiation studies of spores of *Bacillus megaterium* . App. environ. Microbiol. **5**, 61-64

Pulvertaft,R.J.V. & Haynes, J.A. 1951. Adenosine and spore germination : phase contrast studies. J. Gen. Microbiol. **5**, 657

Record,R.R. & Grinstead,K.H. 1954. Physico-chemical properties and molecular weight of spore peptides from *Bacillus megatherium* . Biochem. J. **58**, 85-87

Rubinow,S.I.,1975. Enzyme kinetics. dans " Introduction to mathematical biology ". p46-103. John Wiley & sons inc., USA

Sammons,R.L., Moir,A. & Smith,D.A. 1981. Isolation and properties of spore germination mutant of *Bacillus subtilis* 168 deficient in the initiation of germination. J. Gen. Microbiol. **124**, 229-241

Setlow,B. & Setlow,P. 1979. Localization of low-molecular weight basic proteins in *Bacillus megaterium* spores by cross-linking with ultraviolet light. J. Bacteriol. **139**, 486-494.

Setlow,B. & Setlow,P. 1987. Thymine containing dimers as well as spore photoproducts are found in ultraviolet-irradiated *Bacillus subtilis* spores that lack small, acid soluble proteins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **84**, 421-423.

Setlow,B. & Setlow,P. 1988. Absence of transient elevated UV resistance during germination of *Bacillus subtilis* spores lacking small, acid soluble spore proteins  $\alpha$  and  $\beta$ . J. Bacteriol. **170**. 2858-2859

Setlow,P. 1978. Purification and characterization of additional low-molecular weight basic proteins degraded during germination of *Bacillus megaterium* spores. J. Bacteriol. **136**, 331-340

Setlow,P. 1988. Small acid soluble spore proteins of bacillus species : structure, synthesis, genetics, function and degradation. Ann. Rev. Microbiol. **42**, 319-338

Sharma,R.C. & Jagger,J. 1981. Ultraviolet (254-405 nm) action spectrum and kinetic studies of alanine uptake in *Escherichia coli* B/R. Photochem. Photobiol. **33**, 173-177

Smokursky,J.F., Racine, F.M. & Vary, J.C. 1983. Steady-state fluorescence anisotropy changes of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene in membranes of *Bacillus megaterium* spores. Biochim. Biophys. Acta. **731**, 428-436

Somerville,H.J. 1970. Formation of the parasporal inclusion of *Bacillus thuringiensis* . Eur. J. Biochem. **18**, 226-237

Somerville,H.J., Delafield,F.P. & Rittenberg,S.C. 1970. Urea-mercaptoethanol-soluble protein from spores of *Bacillus thuringiensis* and other species. J. Bacteriol. **101**, 551-560

Stahl,E. 1969. Thin Layer Chromatography. Springer-Verlag, New-York, 1041 p.

Stafford,R.S. & Donnellan,J.E. 1968. Photochemical evidence for conformation changes in DNA during germination of bacterial spores. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **59**, 822-829

Stelma,G.N., Aronson,A.I. & Fitz-James,P. 1978. Properties of *Bacillus cereus* temperature-sensitive mutants altered in spore coat formation. J. Bacteriol. **134**, 1157-1170

Stewart,G.S.A.B., Eaton,M.W., Johnstone,K., Barrett,M.D. & Ellar,D.J. 1980. An investigation of membrane fluidity changes during sporulation and germination of *Bacillus megaterium* K.M. measured by electron spin and nuclear magnetic resonance spectroscopy. Biochim. Biophys. Acta. **600**, 270-290

Stewart,G.S.A.B., Johnstone,K., Hagelberg,E. & Ellar,D.J. 1981. Commitment of bacterial spores to germinate. Biochem. J. **198**, 101-106

Stock,J.B., Stock,A.M. & Mottonen,J.M. 1990. Signal transduction in bacteria. Science. **344**, 395-400

Stuy,J.H. 1956. Studies on the mechanism of radiation inactivation of micro-organisms. III. Inactivation of germinating spores of *Bacillus cereus*. Biochim. Biophys. Acta. **22**, 241-246.

Thibeault,D. & Lefebvre,G.M. 1984. Triggering in unactivated *Bacillus megaterium* spores. Can. J. Microbiol. **30**, 997-1000

Varghese,A.J. 1970. 5-thymine-5, 6 dihydrothymine from DNA irradiated with ultraviolet light. Biochem. Biophys. Res. Comm. **38**, 484-490

Vary,J.C. 1973. Germination of *Bacillus megaterium* after various extraction procedures. J. Bacteriol. **116**, 797-802

Vary,J.C. & Halvorson, H.O. 1965. Kinetics of germination of *Bacillus* spores. J. Bacteriol. **89**, 1340

Venkatasubramanian,P. & Johnstone,K. 1989. Biochemical analysis of the *Bacillus subtilis* 1604 spore germination response. J. Gen. Microbiol. **135**, 2723-2733

Wang,S. 1976. Photochemistry and photobiology of nucleic acids. Academic Press, New-York, Volume I

Wang,T.Z.V. & Rupert,C.S. 1977. Evidence for the monomerization of spore photoproduct to two thymines by the light independent spore repair process in *Bacillus subtilis* . Photochem. Photobiol. **25**, 123-127

Warburg,R. & Moir,A. 1981. Properties of a mutant of *Bacillus subtilis* 168 blocked at an intermediate stage in germination. J. Gen. Microbiol. **124**, 243-253

Warth,A.D. 1978. Molecular structure of the bacterial spore. Adv. in Microbial Physiol. **17**, 1-47

Warth,A.D. & Strominger,J.L. 1972. Structure of the peptidoglycan from spores of *Bacillus subtilis* . Biochemistry. **11**, 1389-1396

Weinberger,S., Evenchik,Z. & Hertman,I. 1984. Transitory UV resistance during germination of UV-sensitive spore produced by a mutant of *Bacillus cereus* 569. Photochem. Photobiol. **39**, 775-780

Yasuda,Y. & Tochikubo,K. 1984. Relation between D-glucose and L-alanine and D-alanine initiation of germination of *Bacillus subtilis* spore. Microbiol. Immunol. **28**(2), 197-207

Zuberi,A.R., Moir,A. & Feavers,I.M. 1987. The nucleotide sequence and gene organization of the ger A spore germination operon of *Bacillus subtilis* 168. Gene. **51**, 1-11

## ANNEXE 1

Analyse théorique du pic de résistance.

Le but de cette section est de démontrer que la surface sous la courbe de la figure 15 A peut être utilisée pour évaluer  $\tau$ , le temps moyen pendant lequel les spores en germination sont dans l'état hautement résistant à l'UV. Pour ce faire, imaginons une spore  $i$  en germination ayant un temps de haute résistance  $\tau_i$ . Cette spore deviendra donc, à un moment quelconque de la germination, viable à la fluence UV utilisée pour une durée  $\tau_i$ . Si l'échantillon contient  $N_{tot}$  spores, la contribution de la spore  $i$  à la surface sous la courbe d'un graphique de survivance en fonction du temps de germination sera égale à :

$$P_r (1/N_{tot}) \times \tau_i \quad (A1.1)$$

où  $P_r$  est la probabilité que la spore dans l'état résistant survive à la dose utilisée. On doit noter que cet élément de surface est indépendant du temps de microlatence de la spore en question : cette contribution est enregistrée peu importe l'endroit où elle se retrouve sur l'échelle du temps de la germination.

Chaque spore engagée dans la germination contribuera d'une façon analogue à la surface sous la courbe. Si  $N_{germ}$  est le nombre de spores qui germent, la surface totale sous la courbe sera par conséquent :

$$\begin{aligned} \text{Surface totale} &= \sum_{i=1}^{N_{germ}} P_r (1/N_{tot}) \times \tau_i \\ &= P_r (1/N_{tot}) \sum_{i=1}^{N_{germ}} \tau_i \end{aligned}$$



$$= P_r(N_{\text{germ}}/N_{\text{tot}}) \sum_{i=1}^{N_{\text{germ}}} (\tau_i/N_{\text{germ}}) \quad (\text{A1.2})$$

La sommation peut s'écrire :

$$\sum_{i=1}^{N_{\text{germ}}} (\tau_i/N_{\text{germ}}) = (\tau_1 + \tau_2 + \dots + \tau_{N_{\text{germ}}}) / N_{\text{germ}} \quad (\text{A1.3})$$

Ceci est la définition d'une moyenne prise sur  $\tau$ . (A1.2) devient donc :

$$\text{Surface totale} = P_r (N_{\text{germ}}/N_{\text{tot}}) \bar{\tau} \quad (\text{A1.4})$$

Cette expression ne tient toutefois pas compte de la contribution des spores non-engagées (à l'état de dormance) à la surface sous la courbe. Cette contribution peut s'écrire :

$$\{1 - (N_{\text{germ}}/N_{\text{tot}})\} P_{\text{nr}} t \quad (\text{A1.5})$$

où:  $P_{\text{nr}}$  = probabilité qu'une spore  
dormante survive à la  
fluence UV utilisée  
 $t$  = temps total de germination  
utilisé pour évaluer la  
surface.

La surface totale mesurée sous la courbe est donc :

$$\text{Surface totale} = P_r (N_{\text{germ}}/N_{\text{tot}}) \bar{\tau} + \{1 - (N_{\text{germ}}/N_{\text{tot}})\} P_{\text{nr}} t \quad (\text{A1.6})$$

Cette dernière équation a été utilisée pour évaluer  $\tau$  tel que décrit dans le texte.